NUOVI STUDI
DELLA
STAZIONE CHIMICO - AGRARIA SPERIMENTALE DI UDINE

PUBBLICAZIONE N. 99

ALDO GIGLIOTTI

LA DETERMINAZIONE DEL METANOLO NEI VINI CON L'ACIDO 1,8 - DIIDROSSI - NAFTALEN - 3,6 - DISOLFONICO

Studio eseguito con il contributo finanziario della Regione Friuli-Venezia Giulia.

NUOVI STUDI
DELLA
STAZIONE CHIMICO - AGRARIA SPERIMENTALE DI UDINE

PUBBLICAZIONE N. 99

ALDO GIGLIOTTI

LA DETERMINAZIONE DEL METANOLO NEI VINI CON L'ACIDO 1,8 - DIIDROSSI - NAFTALEN - 3,6 - DISOLFONICO

ARTI GRAFICHE FRIULANE - UDINE - 1968

LA DETERMINAZIONE DEL METANOLO NEI VINI CON L'ACIDO 1,8 - DIIDROSSI - NAFTALEN - 3,6 - DISOLFONICO

In un precedente lavoro (1) si è messo in luce i numerosi lati negativi del metodo ufficiale italiano di determinazione dell'alcole metilico nei vini, che sono in aperto contrasto con la categoricità dei limiti imposti dalla legge [1]).

Nè d'altra parte il microdosaggio colorimetrico del metanolo di Tavernier e Jacquin (2), pur essendo più sensibile e fedele del succitato metodo ufficiale italiano, soddisfa a quei requisiti di speditezza che vengono richiesti nelle analisi correnti, conservando peraltro le deficienze rilevate nell'uso della fucsina solfitata, cioè la instabilità del reattivo e la mancata rispondenza alla legge di Lambert-Beer (3).

Nel corso degli ultimi anni vari metodi sono stati messi a punto onde aumentare la precisione delle determinazioni del metanolo nelle soluzioni alcoliche. Si è continuato comunque ad operare l'ossidazione dell'alcole metilico ad aldeide formica con $KMnO_4$.

Il metodo di trasformazione dell'alcole nell'aldeide corrispondente è del resto comune alla determinazione quantitativa di tutti gli alcoli alifatici primari (4).

La reazione che porta alla formazione dell'aldeide formica dal metanolo è incompleta ed il suo rendimento è funzione della temperatura, del tempo, della quantità di permanganato usata. La maggior

---

[1]) Il metodo ufficiale italiano prescrive la valutazione visiva del colore. Pur usando il colorimetro difficilmente si raggiunge una precisione di $\pm$ 0.005.

Tale precisione può essere raggiunta però soltanto in condizioni eccezionali, tenendo presente che normalmente l'instabilità del colore ed i vari difetti del metodo, permettono di dare al massimo soltanto la 2ª cifra del contenuto di alcole metilico, in ml/100 di alcole etilico, nei vini.

parte degli autori ha adottato il $KMnO_4$ come ossidante anche se teoricamente ogni altro agente di ossidazione può essere impiegato, salvo che non lasci composti colorati residui come l'acido cromico.

L'ossidazione dell'alcole metilico con permanganato di potassio suggerita da Denigès (5), avviene in mezzo acido per acido solforico al 20% secondo la tecnica di Bertrand e Silberstein (6), in mezzo acido per H_3PO_4 N/I secondo la tecnica di Tavernier Jacquin (2).

Bouzigues (7) ha dimostrato la superiorità del metodo Tavernier su quello di Bertrand, in quanto la resa in aldeide formica nel primo è intorno al 13%, nel secondo è intorno al 3.5% e, ciò che è peggio, non è costante [1].

Di tutti i metodi di determinazione del metanolo, l'ossidazione ad aldeide formica è il punto più delicato.

Innalzando la temperatura, la reazione degrada fino alla formazione di acido formico e anidride carbonica ed il rendimento in CH_2O diventa sempre meno stabile (8). Man mano che ci si avvicina agli 0°C, la resa % in CH_2O diventa costante e la reazione di ossidazione più regolare.

La presenza di alcole etilico, secondo alcuni autori (9), non migliora la costanza della resa in CH_2O. Come si vedrà in seguito, ciò non è vero per le soluzioni a basso contenuto in etanolo.

Resta accertato comunque che, in presenza di etanolo, l'ossidazione dell'alcole metilico deve essere effettuata a concentrazioni alcoliche definite, possibilmente basse onde non aumentare troppo la selettività dell'ossidante nei riguardi dell'etanolo; in altre parole in condizioni standard di concentrazione alcolica.

Quanto ai metodi di rivelazione dell'aldeide formica, due reattivi si sono imposti negli ultimi anni sulla fucsina già ampiamente sperimentata:

1) il cloruro di fenil-idrazina, adottato dallo Schryver (10) con cui il metanolo viene determinato in presenza di potassio ferrocianuro ed in ambiente fortemente acido, secondo la tecnica di Desnuelle e Naudet (11). Il colore violetto che si forma tra il cloruro di fenil-idrazina e CH_2O, dura però solo 15' ca., come ha fatto rilevare Bouzigues, il che rende assai problematica la costruzione di una curva di taratura e la successiva lettura allo spettrofometro.

---

[1]) In realtà però, analizzando il confronto tra i due metodi di ossidazione effettuato da Bouzigues, l'aumento della resa % non può essere imputato soltanto ad una superiorità dell'acido fosforico sull'acido solforico, in quanto nell'esperienza di Bouzigues è stata variata la quantità di $KMnO_4$/ml e la durata dell'ossidazione rispetto al metodo Bertrand, che come si vedrà in seguito, hanno una notevole influenza sulle rese in CH_2O.

2) L'acido cromotropico (1,8-diidrossi-naftalen-3,6-disolfonico) che è stato impiegato per la prima volta da Eegriwe (12).

Il metodo dell'acido cromotropico è stato applicato da Boyd e Logan (13) per la determinazione della serina, da Bricker e Johnson (14) e da Mac Fadyen (15) per la formaldeide, da Boos (16) e da Novelli (17) e Coppello (18) per la determinazione dell'alcole metilico.

Bricker e Johnson hanno dimostrato che il complesso acido cromotropico-CH_2O segue la legge di Lambert-Beer fino a 15 μg/ml di CH_2O, e che il metodo ha la stessa sensibilità di quello del cloruro di fenil-idrazina. Il composto che si forma tra acido cromotropico e CH_2O non ha una costituzione ben definita per quanto si può supporre, come riporta Colagrande (19), abbia origine in due stadi e cioè condensazione e ossidazione del complesso con formazione di un composto a struttura p-chinoide.

E' stato accertato che l'acetaldeide, l'aldeide propionica, l'aldeide butirrica, l'aldeide isobutirrica, l'aldeide isovalerianica non danno colorazione con l'acido cromotropico, mentre l'aldeide glicerica dà una colorazione gialla.

Molte altre sostanze chimiche interferiscono e tra esse l'olio di flemma che però fino a 1.5 mg/ml non disturba la reazione, secondo quanto hanno riscontrato Yamamura e Matsuoka (20).

Bricker e Vail (21), onde evitare le interferenze delle sostanze inibitrici della reazione, hanno suggerito la seguente tecnica:

— evaporare bene a secchezza 1 ml del liquido, contenente la formaldeide e 100 ± 10 mg di acido cromotropico, in bagno ad olio; raffreddare, aggiungere 5 ml di H_2SO_4 concentrato, riscaldare per 30' in acqua bollente, portare a 50 ml in pallone tarato e leggere a 570 mμ.

Si deve notare d'altronde che, nella distillazione del vino, la maggior parte delle sostanze che disturbano la reazione di Eegriwe vengono eliminate. L'alcole etilico che passa nel distillato viene ossidato ad aldeide acetica la quale dà una leggera colorazione gialla che non dà fastidio nelle letture a 570 mμ, come si vedrà in seguito.

Alla determinazione del metanolo nei vini Colagrande (19) ha applicato il metodo di Mathers (22), operando l'ossidazione in bagno di ghiaccio per 30', sul distillato portato al 5% di C_2H_5OH.

Bouzigues ha applicato e modificato la tecnica di Tavernier e Jacquin sostituendo alla fucsina l'acido cromotropico come rivelatore della aldeide formica. L'ossidazione, secondo questo autore, è eseguita in termostato a 35 °C per 20' ed il colore è sviluppato a 70 (± 2) °C per un'ora (7).

Per qualche tempo si è condotta una serie di determinazioni di metanolo nei vini col metodo elaborato da Bouzigues. Si è rilevato però che, pur ottenendo buoni risultati, numerose prove andavano

perdute per inquinamento, a causa della grande sensibilità del metodo, pur avendo posto la massima attenzione nel lavaggio della vetreria.

In effetti il punto debole del procedimento adottato da Bouzigues risiede nell'uso di ben sei pipette e relativi reagenti, con il che, nonostante le precauzioni, si può ben comprendere come il « bianco » non abbia mai superato l'85% di trasmittanza nelle nostre prove.

Prendendo spunto dalla tecnica di Yamamura (20), di Mathers (22) e di Akiya (23), cioè usando $KMnO_4$ come ossidante, in ambiente acido per acido fosforico, Na_2SO_3 come riducente, ci si è proposti lo studio completo dei fattori che influenzano l'ossidazione del CH_3OH a CH_2O e la sua determinazione con l'acido cromotropico.

Lo scopo finale dello studio era l'elaborazione di un semimicrometodo di determinazione dell'alcole metilico nei vini, rapido e sufficientemente preciso.

Parte sperimentale

L'aldeide formica risultante dall'ossidazione del metanolo è stata rivelata in tutte le esperienze eseguite con acido cromotropico (sale bisodico dell'acido 1,8-diidrossi-naftalen-3,6-disolfonico) allo 0.05% preparato secondo la tecnica esposta da Novelli (17), cioè sciolto in acido solforico al 75% (d = 1.67, 12.5 M : 263.6 g di H_2SO_4 al 95% puro per analisi e 70.3 g ca. di H_2O + 100 mg di acido cromotropico) mantenuto a 0°C [1]).

La soluzione di acido cromotropico così preparata può conservarsi per una settimana dopochè, pur dando ancora buoni risultati, rivela una graduale diminuzione di trasmittanza del « bianco ».

Bricker e Johnson (14) hanno proposto di purificare l'acido cromotropico del commercio (talora impuro e contenente fino al 40% di NaCl) precipitandolo in soluzione idroalcolica. In tutte le nostre esperienze si sono impiegate varie marche di sale bisodico dell'acido 1,8 - diidrossi - naftalen - 3,6 - disolfonico: Eastman Kodak (practical), Schuchardt, Fluka. In tutti i reattivi si è riscontrata l'assenza di impurezze, in particolare dei cloruri, il che ci ha evitato ogni operazione di purificazione.

Si è condotta l'ossidazione dell'alcole metilico in ambiente acido per acido fosforico, tecnica suggerita da Mariani (24), dato che secondo

---

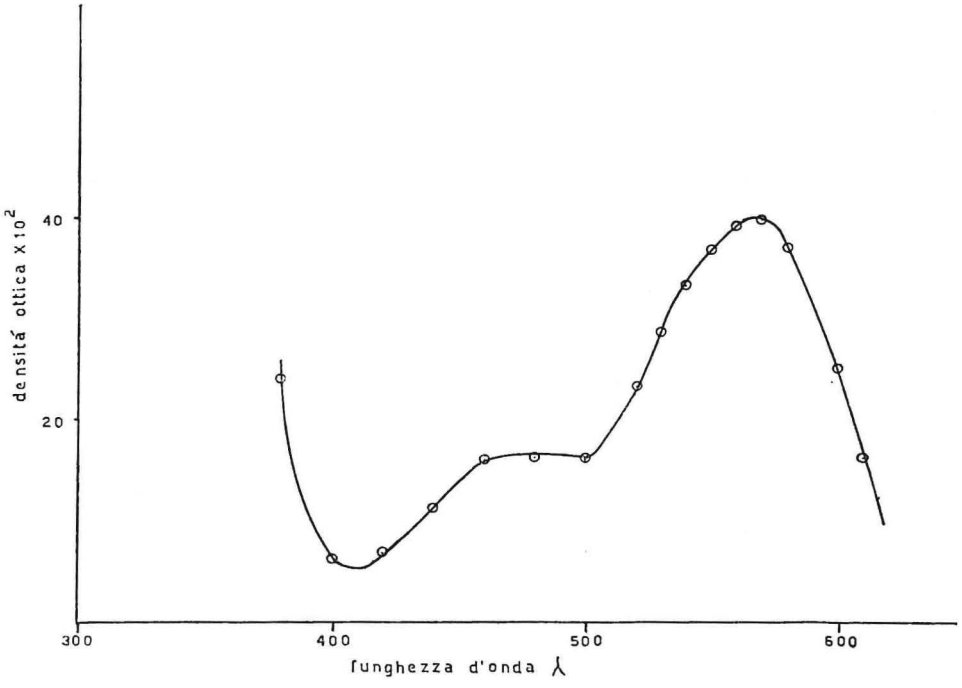
[1]) Si agita continuamente con una bacchettina di vetro, confricando contro le pareti del bicchiere i granuli di consistenza cerosa del reagente, fino a soluzione completa. Il reattivo deve essere tenuto in boccia scura in frigorifero altrimenti si altera assumendo una colorazione rosa.

la dimostrazione data da Bouzigues (7), il rendimento in aldeide formica è maggiore e più costante che non in presenza di acido solforico. Si è pensato inoltre, come d'altronde hanno fatto altri autori, di sciogliere il permanganato in una soluzione acida per acido fosforico, in modo da usare una sola pipetta per l'aggiunta di ossidante alle soluzioni di CH_3OH. L'eccesso di $KMnO_4$ era distrutto da una soluzione di sodio solfito, tenendo presente che 6 mg di $KMnO_4$ venivano ridotti da 12 mg ca. di Na_2SO_3 in ambiente acido, e che una quantità maggiore della teorica di sodio solfito non aveva alcuna influenza sulla trasmittanza delle soluzioni.

Il composto di ossidazione a struttura p-chinoide, che si forma dal complesso di condensazione dell'aldeide formica con l'acido cromotropico (19-25), è di colore rosso violetto e la sua intensità è proporzionale all'aldeide formica e quindi in definitiva all'alcole metilico.

Le misure di trasmittanza dei campioni sono state eseguite con il colorimetro-spettrofometro Spectronic 20 della Bausch & Lomb corredato di provette cilindriche selezionate, del diametro interno di mm. 11.7 ± 0.2 (errore massimo ± 1%). Le misure di estinzione di una soluzione di 120 μg di CH_3OH nel campo del visibile, da 380 a 620 mμ, hanno dato i risultati riportati nel grafico di fig. 1.

Fig. 1 - Spettro di assorbimento di una soluzione contenente 120 μg/ml di alcole metilico dopo ossidazione e reazione con acido cromotropico.



Il massimo di assorbimento è stato riscontrato a 570 mμ: questa lunghezza d'onda è stata adottata per tutte le misure effettuate nel corso del lavoro.

Si sono impiegati i reattivi ed il materiale seguenti:

Reattivi
- H_2SO_4 puro per analisi d = 1.84 (esente da aldeidi)
- H_3PO_4 » » » d = 1.70 ca. 85%
- $KMnO_4$ » » »
- Acido cromotropico, sale bisodico dell'acido 1,8-diidrossinaftalen-3,6-disolfonico (practical) della Eastman organic chemicals.
- CH_3OH, alcole metilico d = 0.791-0.792 a 20°C, titolo 99%. Questo alcole « assoluto » è stato depurato (impurezze H_2O e CH_3-CO-CH_3) facendolo bollire per 4-5 ore su barite e poi distillando con colonna di rettifica.

  Alternativamente si sono ottenuti ottimi risultati facendo bollire a riflusso per 2 ore ca. l'alcole metilico al 99% unitamente a magnesio attivato con Jodio. L'alcole così trattato è stato sottoposto a distillazione frazionata escludendo l'umidità dall'apparecchio di rettifica. Il CH_3OH « frazione cuore » così ottenuto aveva una $d_{20}^{20} = 0.7924$ e un indice di rifrazione $n_{20}^{D} = 1.3292$.

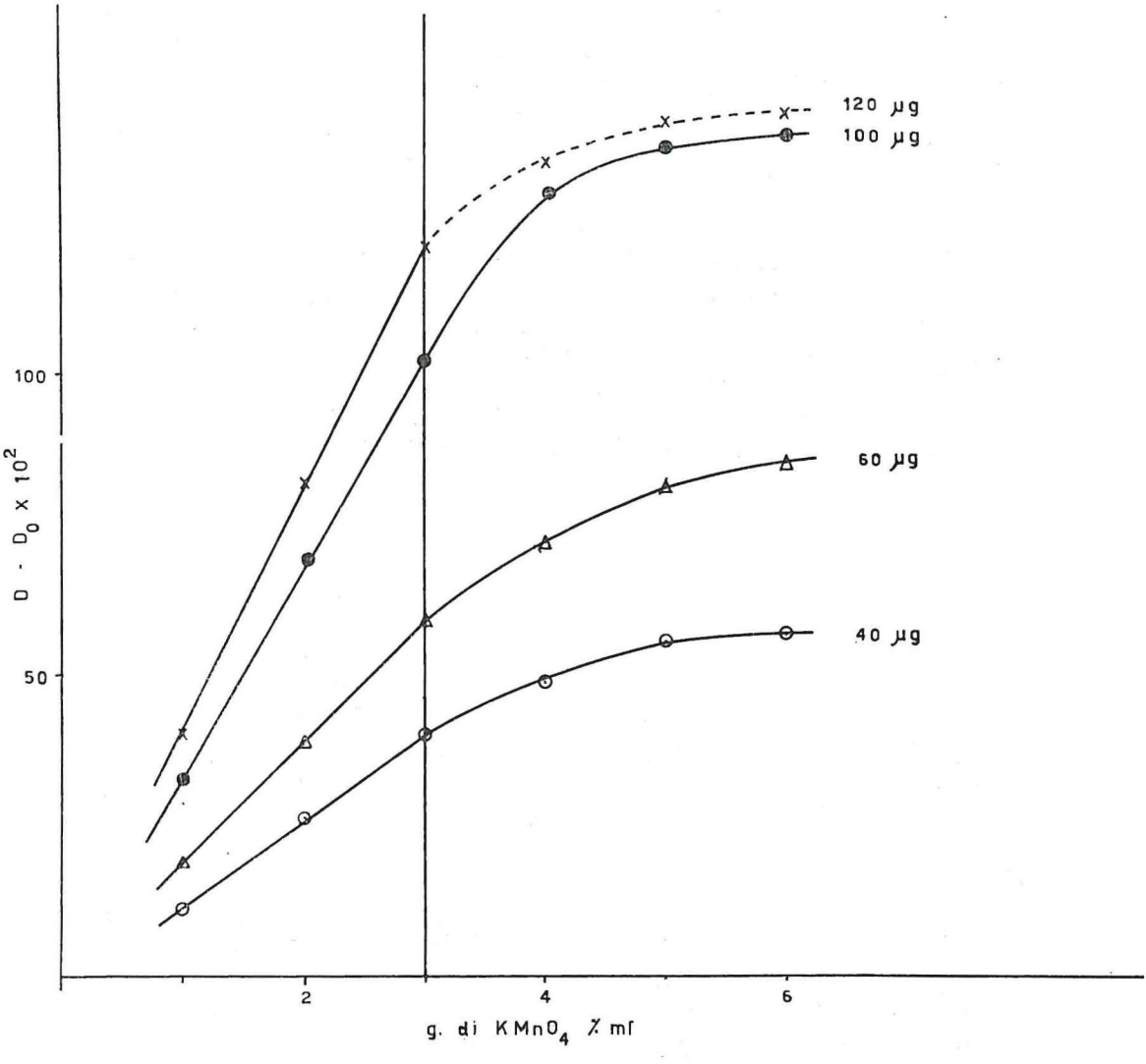
Materiale
- Pipette di precisione graduate da 1 ml (divisione 1/10)
- Palloni tarati da 100-200-1000 ml con tappo in vetro o in plastica.
- Provette in vetro con tappo in plastica a buona tenuta (da batteriologia), del diametro interno di 12 mm e di mm 140 di altezza.
- Ultratermostato a bagno d'acqua aperto, parete trasparente, con sistema autoregolatore della temperatura e circolazione forzata d'acqua. E' della massima importanza che la temperatura sia rigorosamente la stessa in ogni punto del bagno.

Sulla base dei criteri esposti, e cioè ossidazione del metanolo a formaldeide con $KMnO_4$ + H_3PO_4, aggiunta di Na_2SO_3 per neutralizzare l'eccesso di $KMnO_4$, rivelazione del CH_2O con acido cromotropico e sviluppo del colore con l'ebollizione, si è proceduto allo studio dei singoli fattori che influenzano la determinazione del CH_3OH, al fine di stabilirne le condizioni ottimali.

Fig. 2 - INFLUENZA DELLA CONCENTRAZIONE DI $KMnO_4$ SULL'OSSIDAZIONE DEL METANOLO.

In ordinata sono riportate le densità ottiche assolute $\times 10^2$. In ascissa sono riportate le concentrazioni di $KMnO_4$ da 1 a 6 g/100 ml.

○ : 40 μg/ml di CH_3OH
△ : 60 » » »
● : 100 » » »
× : 120 » » »



Influenza della quantità di $KMnO_4$

Per l'ossidazione si sono impiegate sei soluzioni a contenuto variabile da 1 a 6 g/100 ml di $KMnO_4$ e costante di H_3PO_4 (normali in H_3PO_4: g. 3.843 di H_3PO_4 all'85% pari a 2.25 ml ca./100 ml).

L'ossidazione è stata condotta su quattro campioni contenenti 40, 60, 100 e 120 μg/ml di metanolo rispettivamente.

Come si può vedere dai diagrammi di fig. 2 le densità ottiche crescono proporzionalmente col crescere delle quantità di permanganato fino alla concentrazione limite del 3%. Al di sopra del 3% in $KMnO_4$, la retta s'incurva rapidamente e ciò significa che ad un incremento dell'ossidante non corrisponde più un aumento proporzionale della densità ottica e cioè in altre parole, il rendimento della reazione $CH_3OH \rightarrow CH_2O$ decade rapidamente.

La relazione densità ottica-concentrazione in metanolo sino al 3% di $KMnO_4$ segue la legge di Lambert-Beer fino al valore limite di 120 μg/ml.

Ciò appare ancor più chiaramente dai diagrammi di figura 3.

Per le concentrazioni di $KMnO_4$ superiori ai 3 g la linearità della relazione densità ottica-μg/ml di CH_3OH si mantiene ancora valida, ma per valori via via inferiori di metanolo, fino al limite massimo dei 60 μg/ml per la soluzione ossidante contenente 6 g di $KMnO_4$/100 ml.

Essendosi usati 0.2 ml di soluzione ossidante, alle quantità progressive di $KMnO_4$ corrispondevano nella soluzione di CH_3OH da ossidare, le concentrazioni in mg/ml riportate qui sotto:

Concentrazioni in $KMnO_4$/100 ml	$KMnO_4$ in mg/ml
1	1.67
2	3.33
3	5.00
4	6.67
5	8.33
6	10.00

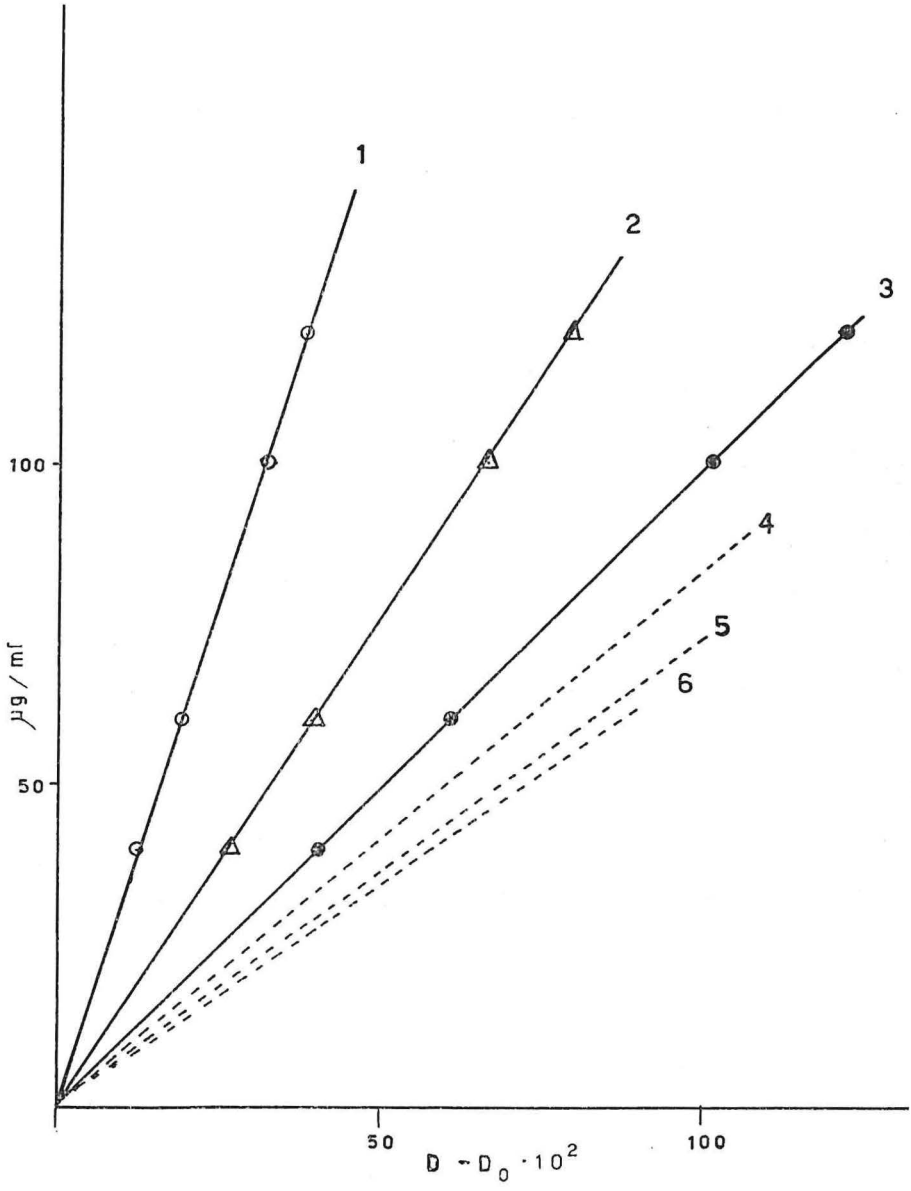
Nella Tabella 1 si riportano le quantità di $KMnO_4$ adottate dai vari autori per l'ossidazione della soluzione di metanolo, e nell'ultima colonna i corrispondenti valori in mg/ml.

TABELLA 1

Autori	ml di soluzione complessivi	mg. di $KMnO_4$	mg di $KMnO_4$ per 1 ml di soluzione
Bouzigues (7)	2.4	24	10
Yamamura (20)	1.2	10	8.33
Mathers (22)	3.0	60	20

Fig. 3 - INFLUENZA DELLA CONCENTRAZIONE DI $KMnO_4$ SULL'OSSIDAZIONE DEL METANOLO.

In ordinata sono riportate le quantità di metanolo in μg/ml, in ascissa le densità ottiche assolute $\times 10^2$. I numeri segnati al vertice di ciascuna retta si riferiscono alle concentrazioni in $KMnO_4$/100 ml.



La quantità maggiore di $KMnO_4$ per ml di soluzione di metanolo è impiegata dal Mathers (22), però si deve notare che l'Autore adotta l'ossidazione a 0°C onde evitare uno sviluppo irregolare della reazione di ossidazione ed una sua degradazione a CO_2, da cui deriva la mancata linearità della relazione densità ottica-concentrazione in metanolo. Yamamura e Matsuoka (20) d'altronde usano anch'essi una maggiore concentrazione in ossidante, però adottano come limite massimo della quantità di metanolo, entro cui è rispettata la validità della legge di Lambert-Beer, 20 μg/ml.

Nelle nostre esperienze si è rilevato che, impiegando nell'ossidazione 3 g/100 ml di permanganato di potassio, pari a 5 mg/ml, la legge di Lambert-Beer è valida fino al limite massimo dei 120 μg/ml, più che sufficiente per la determinazione del metanolo nei vini.

Influenza della concentrazione in acido fosforico

Tavernier e Jacquin (2) hanno consigliato l'ossidazione del metanolo in ambiente acido per acido fosforico, per due principali ragioni, e cioè la maggiore costanza del rendimento nei riguardi dell'acido solforico, ed una resa superiore in aldeide formica. Dello stesso parere è Bouzigues (7).

Si è voluto confrontare l'ossidazione in presenza di acido fosforico in quantità scalare da 1 a 5 grammo-equivalenti/L (la soluzione ossidante conteneva sempre 3 g di $KMnO_4$ + 0.1-0.2-0.3-0.4-0.5 grammo-equivalenti di H_3PO_4/100 ml) ed in presenza di acido solforico 1 normale. Le soluzioni di metanolo, ossidate per 20' in termostato a 20°C, contenevano 40-80-120 μg/ml.

Si sono ottenute le letture riportate in tabella 2.

TABELLA 2

Soluzioni	g di H_3PO_4 85% portati a 100 ml	Densità ottiche assolute per soluzioni di CH_3OH contenenti: 40	80	120 μg/ml
1 N	3.843	41.4	79.2	119.3
2 N	7.687	42.0	83.5	122.0
3 N	11.529	42.0	85.0	125.0
4 N	15.373	43.6	88.2	130.5
5 N	19.215	43.8	90.0	132.0
1 N H_2SO_4	5.162 (95%)	15.5	34.8	51.2

Come ha osservato Mariani (24) l'acido fosforico ha il vantaggio di favorire l'ossidazione del CH_3OH rispetto al C_2H_5OH, cioè in altre parole, a parità di concentrazione, con l'acido fosforico si ottengono realmente rese più elevate in aldeide formica che non con l'acido solforico. Ciò non era molto chiaro nell'esperienza di Bouzigues (7) dato che l'autore aveva confrontato il metodo Tavernier Jacquin (2) (acido fosforico) e Bertrand (6) (acido solforico), ma in presenza di quantità differenti di permanganato (24 mg nel primo e 3 mg nel secondo).

Come si può constatare dalla figura 4 le concentrazioni in acido fosforico non hanno eccessiva influenza nella resa in CH_2O nell'intervallo 1-5 N. Soltanto dagli 80 μg/ml in su, cioè per le concentrazioni in metanolo più elevate, si ha un sensibile aumento dei valori della densità ottica.

Influenza dei tempi di ossidazione

Come è stato detto precedentemente, si è pensato bene di adottare il tempo di ossidazione di 20' in tutte le esperienze e ciò in considerazione della quantità di permanganato piuttosto bassa: 5 mg/ml, corrispondente a 3 g/100 ml della soluzione ossidante.

La scelta di questo tempo di ossidazione è stata fatta come la più conveniente, per costanza di resa in CH_2O e sulla base di una lunga esperienza.

Al fine di scegliere il tempo di azione del $KMnO_4$ più opportuno, si è proceduto alla ossidazione di una serie di soluzioni contenenti 40-80-120 μg/ml di CH_3OH per tempi progressivamente crescenti: 5' - 10' - 15' - 20' - 30' - 40' - 50' - 60', ferme restando le altre condizioni di esperienza: temperatura di ossidazione di 20°C e concentrazione in $KMnO_4$ della soluzione ossidante (3 g di $KMnO_4$ e ml. 2.3 di H_3PO_4 in 100 ml). La soluzione riducente conteneva una quantità maggiore del normale di Na_2SO_3 cioè 20 g per 100 ml, in considerazione del fatto che, per tempi di ossidazione piccoli, restavano libere notevoli quantità di $KMnO_4$ e si rendeva necessaria una dose di Na_2SO_3 maggiore della teorica, per ridurle rapidamente ed avere soluzioni limpide.

Le letture ottenute sono riportate nel grafico di figura 5.

Come si può constatare la relazione densità ottica-tempo di ossidazione è una funzione progressivamente crescente, con dei massimi intorno ai 20'. Ciò equivale a dire che le maggiori rese della reazione $CH_3OH \rightarrow CH_2O$ si ottengono con un tempo di ossidazione di 20'.

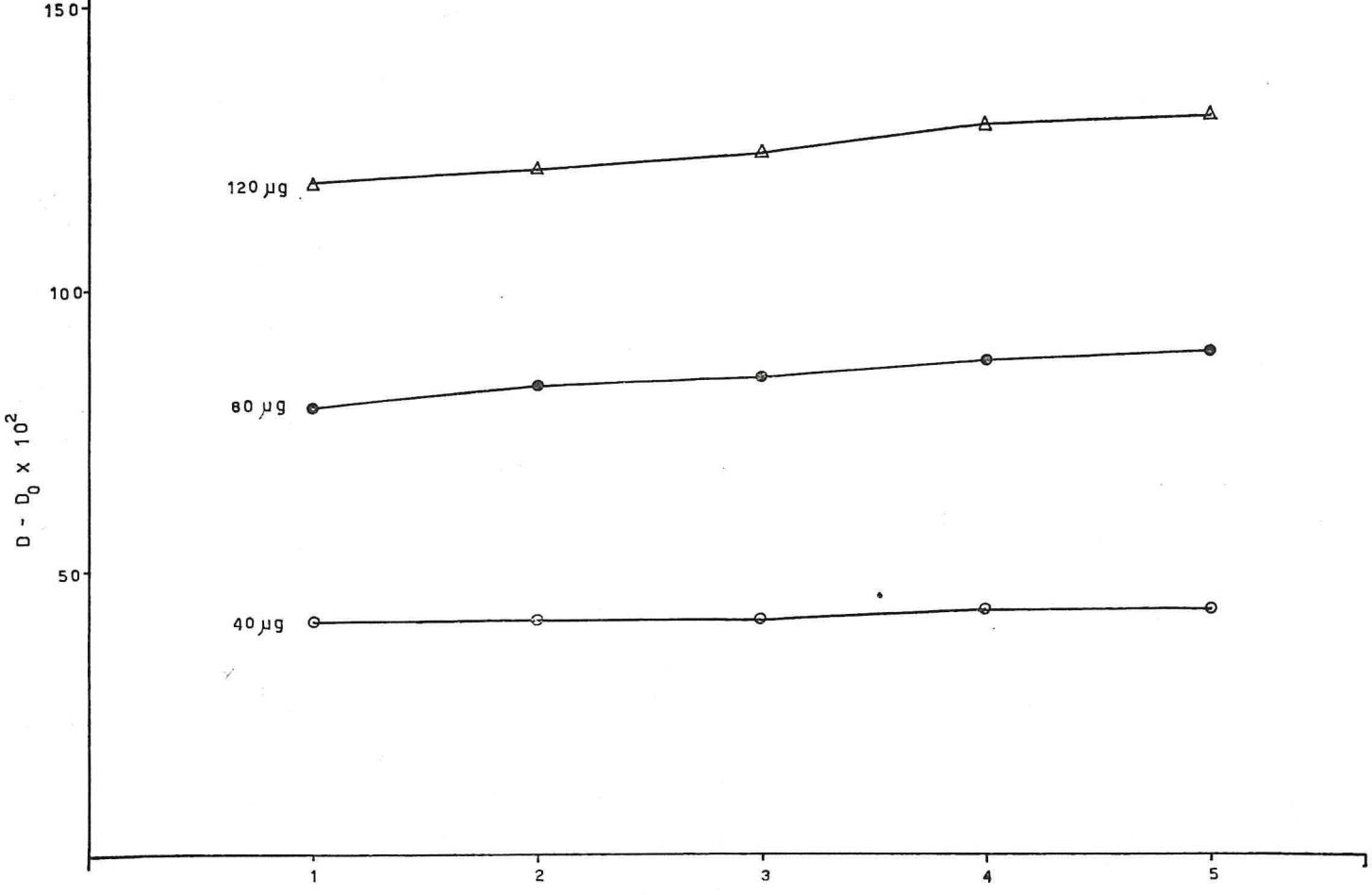


Fig. 4 - INFLUENZA DELLE CONCENTRAZIONI IN H_3PO_4 SULL'OSSIDAZIONE DEL METANOLO, A PARITA' DI CONTENUTO IN $KMnO_4$, 3 g/100 ml.
In ordinata sono riportate le densità ottiche assolute $\times 10^2$, in ascissa i grammo-equivalenti di H_3PO_4.

○ : 40 µg/ml di CH_3OH
● : 80 » » »
△ : 120 » » »

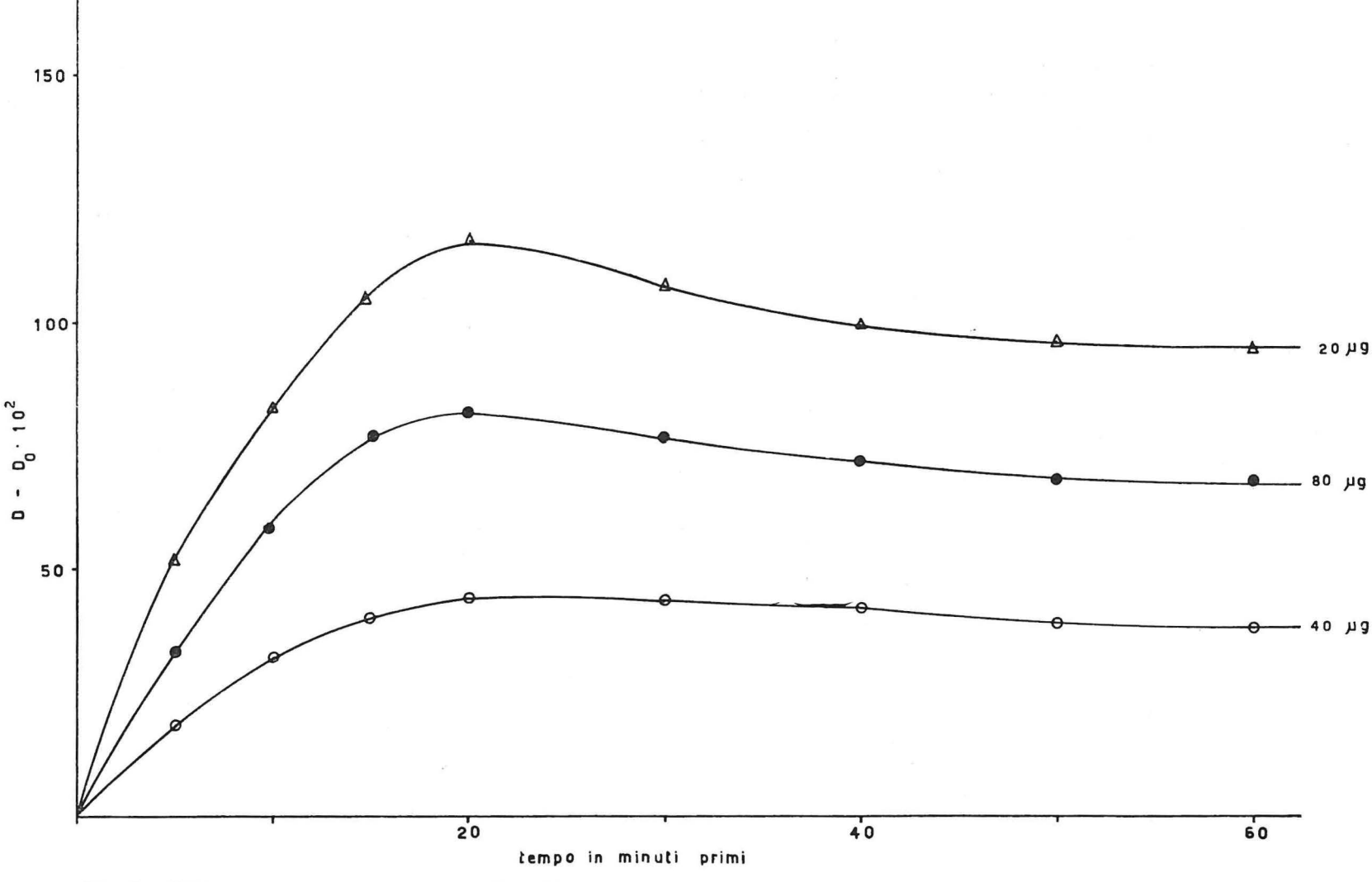


Fig. 5 - INFLUENZA DEI TEMPI DI OSSIDAZIONE.
In ordinata sono riportate le densità ottiche $\times 10^2$, in ascissa i tempi di ossidazione in minuti primi.

○ : 40 µg/ml di CH_3OH
● : 80 » » »
△ : 120 » » »

Influenza della quantità di acido cromotropico aggiunta e della temperatura

In tutte le esperienze precedenti si erano aggiunti 3 ml di acido cromotropico allo 0.05% lasciato cadere goccia a goccia. Le provette erano immerse in un bagno di ghiaccio, erano agitate con movimento di rotazione continuo, durante l'aggiunta dell'acido cromotropico, e contenevano 1.4 ml di liquido alla fine della fase ossidazione-riduzione.

La scelta dei 3 ml di acido cromotropico è stata fatta perchè con questa quantità si ottengono dei massimi nel valore della densità ottica. Ciò è messo in evidenza nella figura 6.

Il fenomeno è legato probabilmente alla reazione di condensazione e ossidazione del composto aldeide formica-acido-1,8-diidrossi-naftalen-3,6-disolfonico e non ad una maggiore resa in CH_2O.

La temperatura adottata nel corso delle esperienze era di 20°C. Come è stato detto precedentemente la temperatura ha un effetto notevole sull'andamento dell'ossidazione dell'alcole metilico ad aldeide formica.

Cinque soluzioni contenenti 20-40-60-80-100 μg/ml di metanolo sono state ossidate in termostato a 15-20-25° C, restando immutate le altre condizioni di esperienza. Si sono ottenute le rette di figura 7:I, II, III rispettivamente. Si deduce che la legge di Lambert-Beer è valida nell'intervallo da 15 a 25°C. e che nel passaggio da 15 a 25°C il gradiente di temperatura, definito come D_t-D_{to}, per $t > t_o$, a parità di contenuto in metanolo, è positivo e che in particolare D_{25}-$D_{20} < D_{20}$-D_{15} in cui D è la densità ottica del campione a contenuto determinato di alcole metilico.

Come è stato già detto, nel corso delle esperienze si è adottata la temperatura di ossidazione di 20°C come la più comoda perchè prossima alla temperatura ambiente. Si è però accertato il fatto che più bassa è la temperatura, più costante è il rendimento in CH_2O. Con temperatura di ossidazione maggiore di 25°C la costanza delle rese in CH_2O viene a mancare sempre più, e ciò perchè la reazione di ossidazione del metanolo viene spinta fino a degradare a HCOOH e a CO_2.

Influenza del contenuto alcolico

Il Mathers (22) nella determinazione del metanolo consiglia una concentrazione alcolica del 5-6% di alcole etilico (ml/100 ml), Yamamura (20) prescrive di operare l'ossidazione di 20 μg di CH_3OH al massimo. Considerando un vino di 10°, contenente 110 mg/L di metanolo, si dovrebbe lavorare in definitiva con un contenuto alcolico del

Fig. 6 - INFLUENZA DELLA QUANTITA' DI ACIDO CROMOTROPICO AGGIUNTO.

In ordinata sono riportate le densità ottiche $\times 10^2$, in ascissa le quantità di acido cromotropico in ml.

○ : 40 μg/ml di CH_3OH
● : 80 » » »
△ : 120 » » »

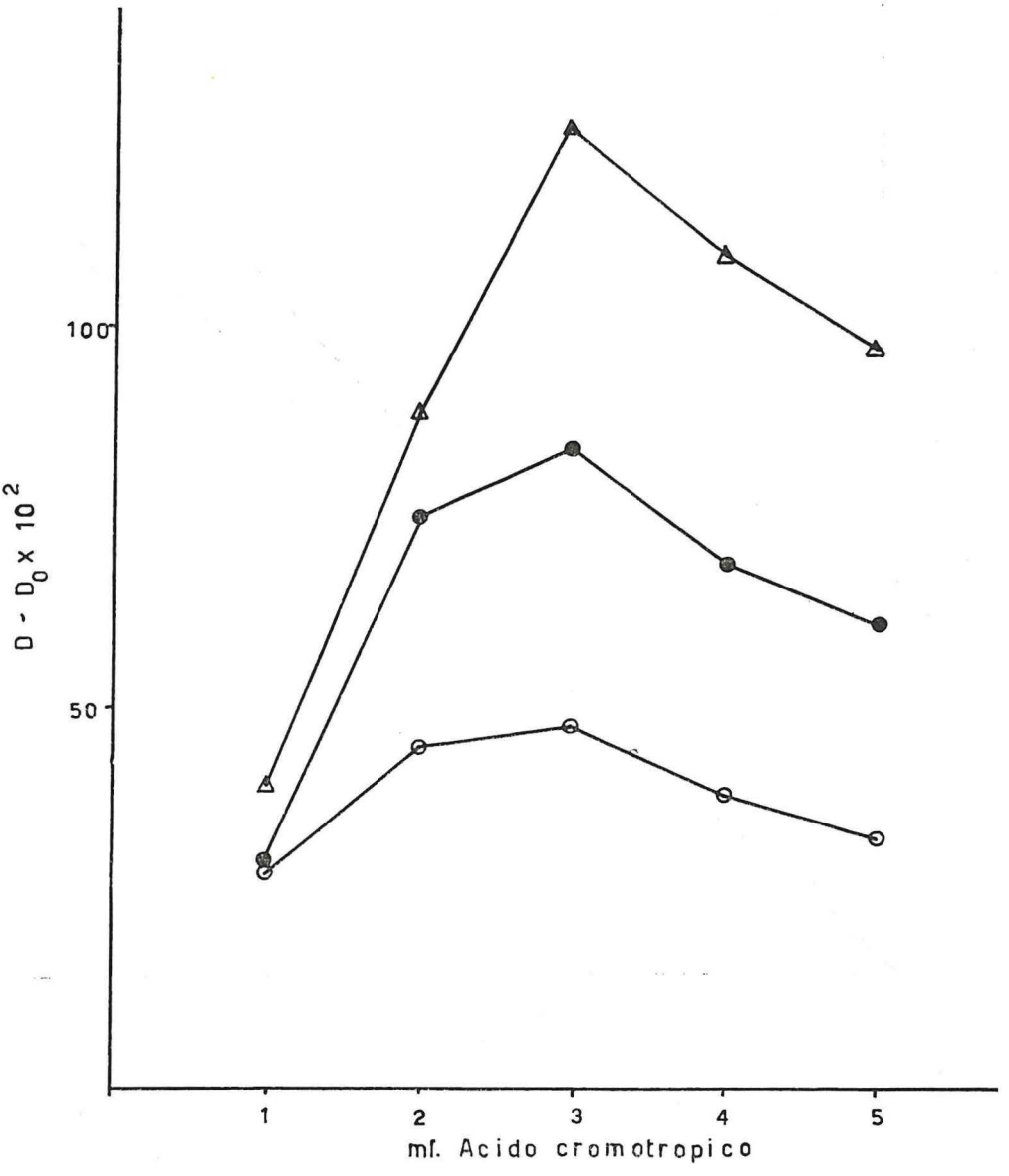
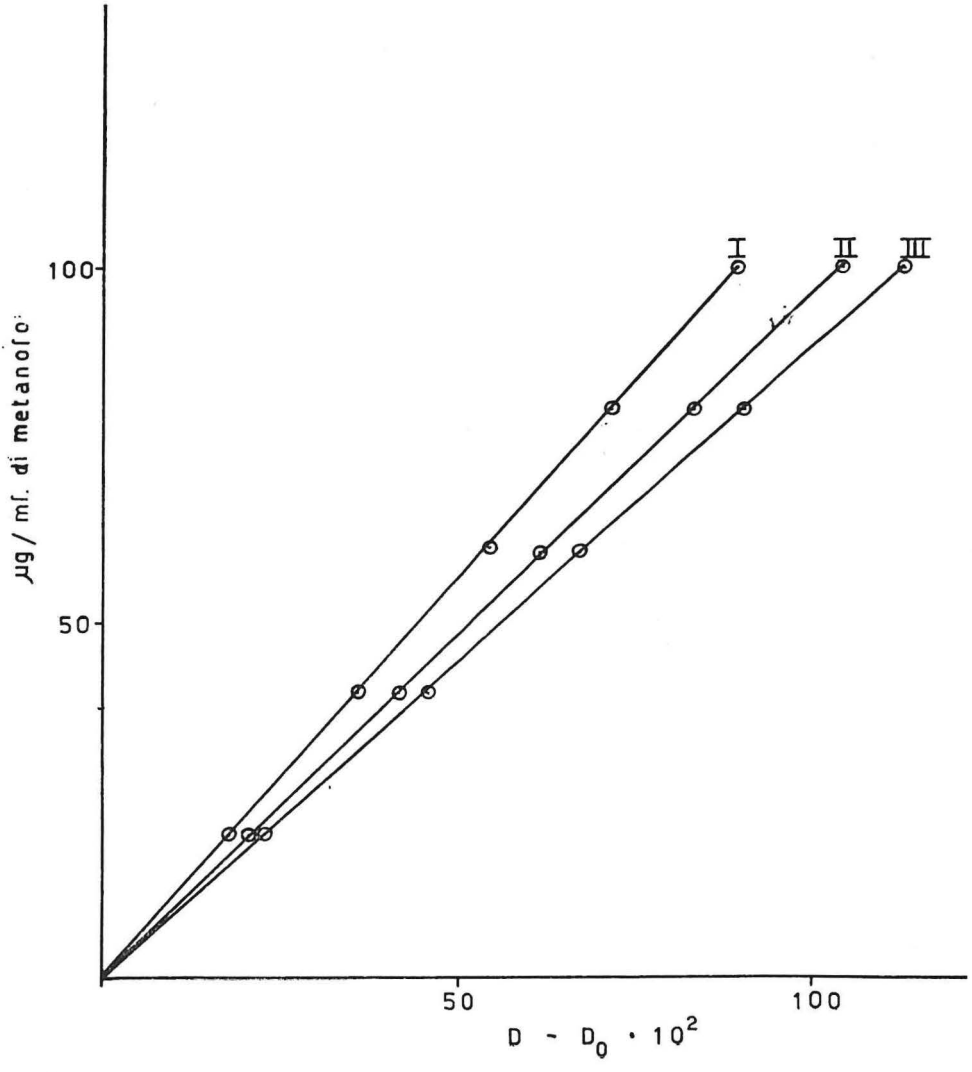


Fig. 7 - INFLUENZA DELLA TEMPERATURA DI OSSIDAZIONE.

In ordinata sono riportate le quantità di metanolo in μg/ml, in ascissa le corrispondenti densità ottiche assolute. I numeri romani I, II, III, si riferiscono ai dati ottenuti a 15, 20, 25° C rispettivamente.



2% (es.: distillare 20 ml di vino, portare a 100 ml e operare l'ossidazione su 1 ml).

Akiya e Sasao (23) prescrivono di distillare 20 ml di vino, di portare a 100 10 ml dei 20 distillati e determinare il CH_3OH su 1 ml (1% concentrazione finale di C_2H_5OH per un vino di 10°). Si può obiettare che quantità così piccole di vino siano realmente poco rappresentative del campione e conducano, nella fase prelevamento e distillazione, a errori notevoli.

Tavernier (2) e Bouzigues (7) consigliano invece di ossidare il metanolo in presenza di 2.5 ml di C_2H_5OH/100 ml di soluzione.

Al fine di confermare la validità di quanto affermato da Bouzigues, si è istituita una serie di esperienze in cui si sono ossidate soluzioni a contenuto variabile di C_2H_5OH, in presenza di 20, 40, 60 μg/ml di CH_3OH. Si è partiti dalle seguenti soluzioni:

1) 10 g di CH_3OH (depurato) $\rightarrow$ 1 L
2) 20 ml di sol. 1 + quantità variabili di C_2H_5OH $\rightarrow$ 200 ml (1 ml = 1 mg di CH_3OH)
3) Quantità variabili di C_2H_5OH $\rightarrow$ 1 L (« bianco »).

Alle quantità variabili di alcole etilico delle soluzioni 2 e 3 corrispondevano i valori riportati nella tabella 3 nella cui ultima colonna sono segnati, per ogni concentrazione alcolica, i corrispondenti rapporti $\frac{C_2H_5OH}{CH_3OH}$ per 20 μg/ml di CH_3OH.

TABELLA 3

ml di C_2H_5OH per 100 ml di soluzione	ml di C_2H_5OH al 99.2% aggiunti alla soluzione 2	ml di C_2H_5OH al 99.2% aggiunti alla soluzione 3	Rapporto $\frac{C_2H_5OH}{CH_3OH} \cdot 10^2$
0	0	0	0
2	4.03	20.16	7.98
4	8.06	40.32	15.96
6	12.10	60.48	23.94
8	16.13	80.64	31.92
10	20.16	100.81	39.90
12	24.19	120.96	47.88
14	28.22	141.13	55.86

Le altre condizioni di esperienza, salvo il contenuto percentuale di alcole etilico, sono rimaste invariate nel corso delle determinazioni. In particolare si aveva: $KMnO_4$ 3% in soluzione normale di H_3PO_4, Na_2SO_3 8 g/100 ml, temperatura del termostato 20°C ± 0.2, tempo di ossidazione 20', 3 ml di acido cromotropico allo 0.05% aggiunto a gocce in bagno a 0°C, ebollizione delle provette ben tappate per 30', lettura al colorimetro-spettrofometro a 570 mμ.

Le soluzioni a 20 - 40 - 60 μg/ml di CH_3OH erano ottenute portando a 100 ml con la soluzione 3 : 2 - 4 - 6 ml di soluzione 2. Le prove erano 4 per ogni singola percentuale di alcole etilico.

Si è riscontrato che effettivamente la presenza di alcole etilico migliora e rende più costante e stabile la reazione di ossidazione del metanolo, nelle nostre condizioni di esperienza, contrariamente a quanto era stato affermato dal Langejan (9). Le letture eseguite sui campioni di metanolo allo 0% di C_2H_5OH ripetute più volte, hanno dato una gamma variabile di valori per ogni singolo contenuto in metanolo e non un dato costante:

Metanolo in μg/ml	Densità ottiche assolute x 10^2
20	da 31 a 38
40	da 54 a 67
60	da 82 a 94

In presenza di etanolo invece, con ogni soluzione di alcole metilico, sono stati ottenuti dei valori costanti, ben definiti e ripetibili.

Infatti le oscillazioni, riscontrate nel ripetere le determinazioni dei campioni a partire dal 2% in etanolo in su, sono state minime.

Si è potuto quindi tracciare il diagramma di figura 8 in cui le linee tratteggiate verticali, sull'asse delle ordinate, segnano l'intervallo entro cui sono oscillate le letture delle soluzioni allo 0% in etanolo, e mettono in luce l'instabilità dei valori ottenuti in assenza di alcole etilico.

Dal 2% di etanolo in poi ogni concentrazione in alcole etilico ha dato, per i singoli valori in metanolo, misure perfettamente ripetibili e pressochè costanti.

Si rileva come, col crescere del tenore in etanolo, i valori delle densità ottiche si abbassano con regolarità; ciò verosimilmente, per il fatto che crescendo il rapporto $\frac{\text{etanolo}}{\text{metanolo}}$, minore è la quantità di permanganato di potassio disponibile per ossidare una data quantità di alcole metilico ad aldeide formica, e quindi minore è il rendimento in quest'ultima.

A prima vista qualsiasi concentrazione alcolica, al di sopra del 2%, potrebbe essere adottata nell'ossidazione del metanolo ad aldeide

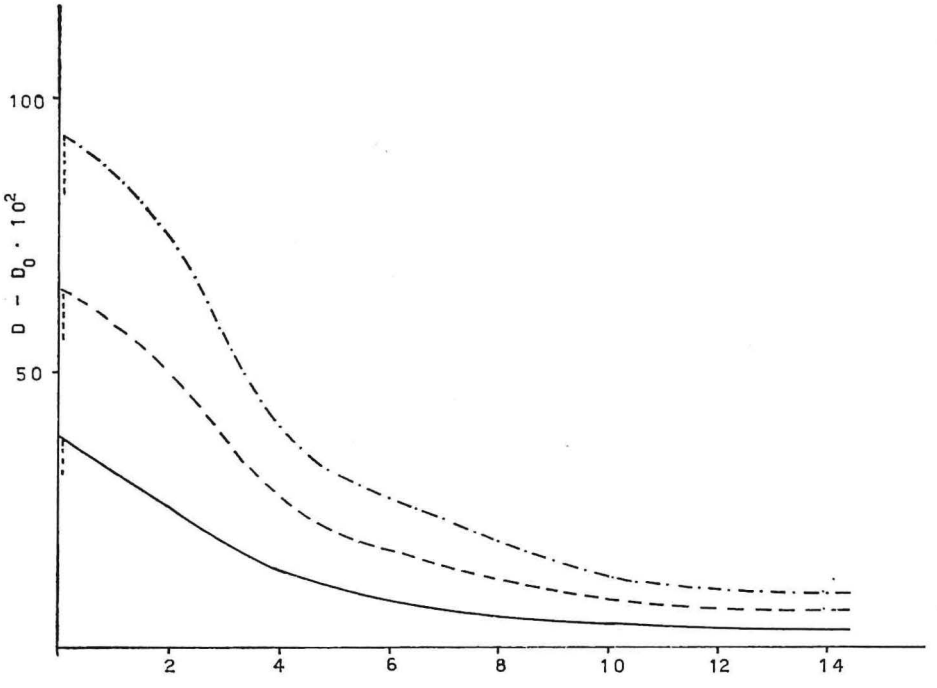
formica. Si è scelta la concentrazione del 2.5%, analogamente a quanto suggerito da Tavernier (2) e Bouzigues (7), per le seguenti ragioni:

1) perchè i valori della densità ottica delle soluzioni al 2.5% in etanolo sono sufficientemente elevati e particolarmente costanti a parità di contenuto in metanolo.

2) I punti relativi sono collocati su una retta molto prossima alla bisettrice del diagramma: densità ottiche · 10^2 - CH_3OH μg/ml, almeno nelle condizioni di esperienza adottate, ed in particolare per le letture ottenute usando le provette cilindriche dello « Spectronic 20 ».

Fig. 8 - INFLUENZA DEL CONTENUTO ALCOLICO.
In ordinata sono riportate le densità ottiche assolute. La linea tratteggiata parallela all'asse delle ordinate comprende l'intervallo di lettura per lo 0% di C_2H_5OH. In ascissa sono riportate le concentrazioni % in alcole etilico.

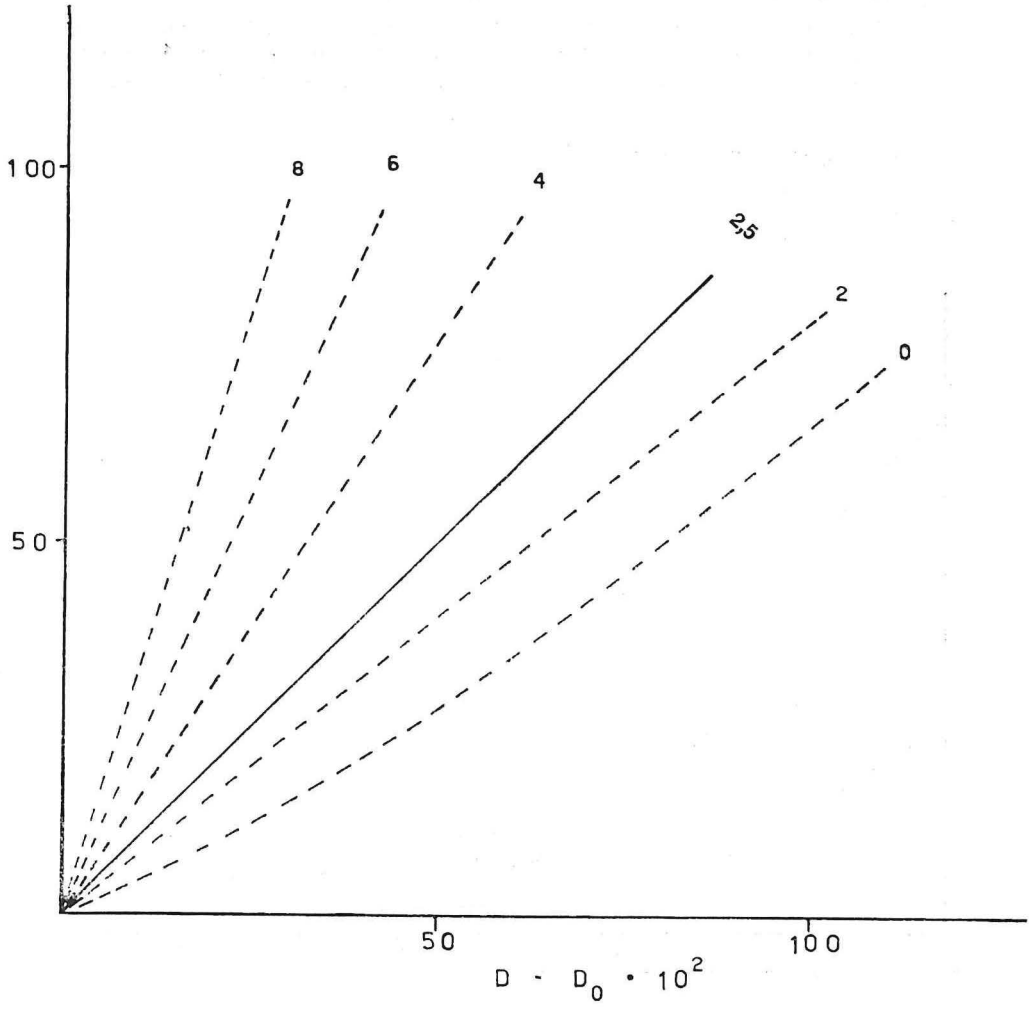
———: 20 μg/ml di CH_3OH
— — —: 40 » » »
—·—·—: 60 » » »



Ciò appare evidente dal grafico di figura 9, in cui si vede come al di sopra della retta (concentrazione in etanolo del 2.5%) a parità di $\triangle$ μg/ml di metanolo, sempre minore diventa la differenza delle rispettive densità ottiche, cioè in altre parole la pendenza delle rette, in cui la densità ottica è funzione del contenuto in CH_3OH, aumenta.

Fig. 9 - INFLUENZA DEL CONTENUTO ALCOLICO.

In ordinata sono riportate le concentrazioni in metanolo in μg/ml, in ascissa le densità ottiche assolute $\times$ 10^2. La retta a tratto continuo si riferisce alla concentrazione alcolica del 2.5%; le altre tratteggiate alle diverse percentuali adottate nell'esperienza.



D'altronde per contenuti alcolici troppo bassi, tendenti a 0, aumenta di pari passo l'instabilità del rendimento in CH_2O, il che porta a scartare le concentrazioni troppo basse. Si deve considerare infine che l'adozione di concentrazioni alcoliche inferiori al 2.5%, porta di conseguenza a diminuire ulteriormente la quantità di vino, già esigua, da sottoporre alla distillazione.

3) Se si considera che il 70% circa dei vini friulani contiene da 72 a 162 mg/L di metanolo (1) (le medie degli altri vini italiani non sono molto diverse), supponendo di avere un vino con il 10% di alcole etilico, avremmo un contenuto in metanolo nelle determinazioni, che varia da 18 a 40 μg/ml corrispondentemente.

Nella figura 9 questi valori estremi in metilico corrispondono, lungo la retta segnata 2.5 alle densità ottiche x 10^2 20 e 40 rispettivamente. Questo intervallo è ampiamente compreso entro i limiti del 20 e dell'80 (densità ottiche 0.20 - 0.80, trasmittanza 63 e 16% rispettivamente) a cui corrisponde un errore relativo di analisi minimo, cioè dove massima è l'accuratezza delle misure spettrofotometriche, come è stato dimostrato dal Ringbom (26).

Si può dedurre dunque, da quanto sopra esposto, che la concentrazione alcolica del 2.5% adottata è la più conveniente.

Dai diagrammi di figura 8 e 9, anche l'uso della concentrazione del 2% in etanolo delle soluzioni di alcole metilico risulterebbe altrettanto giustificato quanto quello del 2.5%, mentre una quantità minore porterebbe sicuramente a valori poco costanti. Al limite dello 0%, cioè in assenza di alcole etilico, i valori delle densità non sono su una retta ma su una linea curva. La reazione di ossidazione del CH_3OH mette in libertà quantità di CH_2O talmente variabili da non seguire la legge di Lambert-Beer.

Qualche autore (27-28) consiglia di eseguire una distillazione frazionata con refrigerante a riflusso, onde concentrare le soluzioni alcoliche di metanolo. L'operazione non è esente da critica, come si vedrà in seguito, se si pensa alla possibilità di inquinamento non trascurabile a causa della elevata sensibilità del metodo, e alle inevitabili perdite che si hanno nella distillazione frazionata.

Resta valido inoltre quanto ha osservato il Tavernier (2), e cioè che un eventuale arricchimento in metanolo del distillato, porta un corrispondente aumento del tenore in alcole etilico e col crescere di quest'ultimo, diminuisce come si può vedere dal diagramma di figura 8, la densità ottica del campione.

Ne consegue che una concentrazione del liquido in alcole complessivo (metanolo + etanolo) non raggiunge lo scopo di aumentare la precisione delle determinazioni.

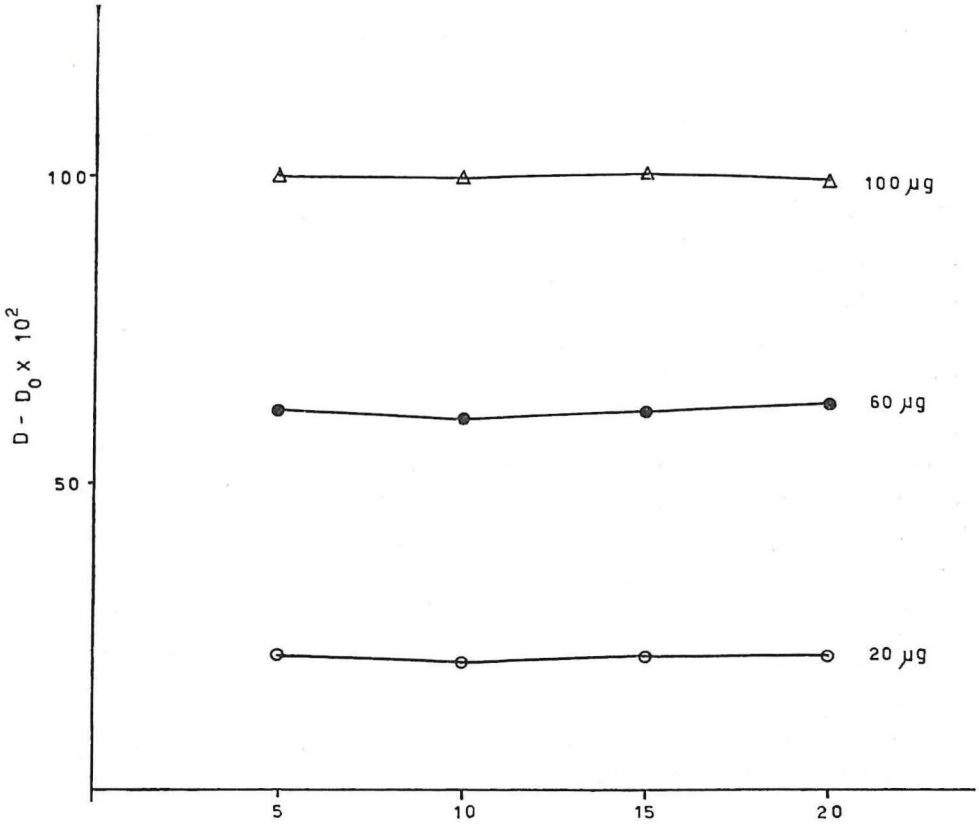
Influenza dei tempi di ebollizione

Nel corso delle esperienze per mettere a punto il metodo, si è accertato che i tempi di sosta delle provette in termostato, dopo aggiunta del solfito, erano pressochè privi di influenza sulle quantità di metanolo determinate. Dopo 5' di sosta in termostato, le provette erano immerse in un bagno di ghiaccio in attesa di aggiungere subito dopo il reattivo. Che il tempo di permanenza abbia influenza minima, risulta dal grafico di figura 10 in cui sono riportate le densità ottiche di tre campioni di alcole metilico contenenti 20 - 60 - 100 μg/ml, tenuti in termostato per 5 - 10 - 20 minuti rispettivamente.

Fig. 10 - INFLUENZA DEI TEMPI DI SOSTA IN TERMOSTATO DOPO AGGIUNTA DI Na_2SO_3.

In ordinata sono riportate le densità ottiche assolute $\times 10^2$, in ascissa i tempi di sosta in minuti.

○ : 20 μg/ml di CH_3OH
● : 60 » » »
△ : 100 » » »



Si è standardizzato il tempo di sosta in termostato in 5', dopo di che vengono aggiunti i tre ml di acido cromotropico goccia a goccia. E' necessario tenere le provette a 0° C, durante l'aggiunta dell'acido cromotropico (il tempo di scolamento è di 45" circa per ogni prova) e agitare per disperdere il calore di soluzione dell'acido solforico in acqua, onde evitare un aumento della temperatura ed una conseguente perdita di aldeide formica molto volatile.

L'acido cromotropico sciolto in H_2SO_4 concentrato, invece che in H_2SO_4 al 75%, dà colori più intensi e quindi valori più elevati di densità ottica, a parità di contenuto in CH_3OH. Nel corso delle esperienze si è adottato l'acido cromotropico al 75% preparato secondo la tecnica di Novelli (17), perchè si conserva molto bene in frigorifero per 6-7 giorni, tempo sufficiente per una serie di determinazioni, e perchè un ulteriore aumento di colore non si è reso necessario.

Come è già stato accennato (25), il colore rosso violetto che si forma dopo aggiunta dell'acido 1,8-diidrossi-naftalen-3,6-disolfonico durante l'ebollizione, è dovuto alla forma p-chinoide di ossidazione del composto di condensazione dell'acido cromotropico con aldeide formica, in presenza di una sostanza disidratante, quale l'acido solforico.

Una volta aggiunto il reattivo si deve sviluppare il colore, cioè creare una condizione tale che si formi il composto di condensazione e che quest'ultimo si ossidi. La velocità di formazione del composto colorato è funzione della temperatura: più alta la temperatura, minore il tempo impiegato per raggiungere una data intensità del colore rosso violetto.

Bouzigues (7) prescrive di tenere le provette in bagno maria a 70° C per un'ora, il Mathers (22) per 30' ad una temperatura compresa tra i 60 e 100° C, Colagrande (19) adotta il tempo di 15' e la temperatura di 70° C.

Nelle nostre esperienze si è preferito operare a 100° C o meglio in bagno d'acqua ad ebollizione vivace, onde evitare l'uso del termostato e la ben nota difficoltà di ottenere una temperatura elevata e costante nello stesso tempo, in ogni punto del bagno. Una variazione della temperatura di sviluppo anche piccola ha infatti una influenza notevole sulla intensità del colore [1]).

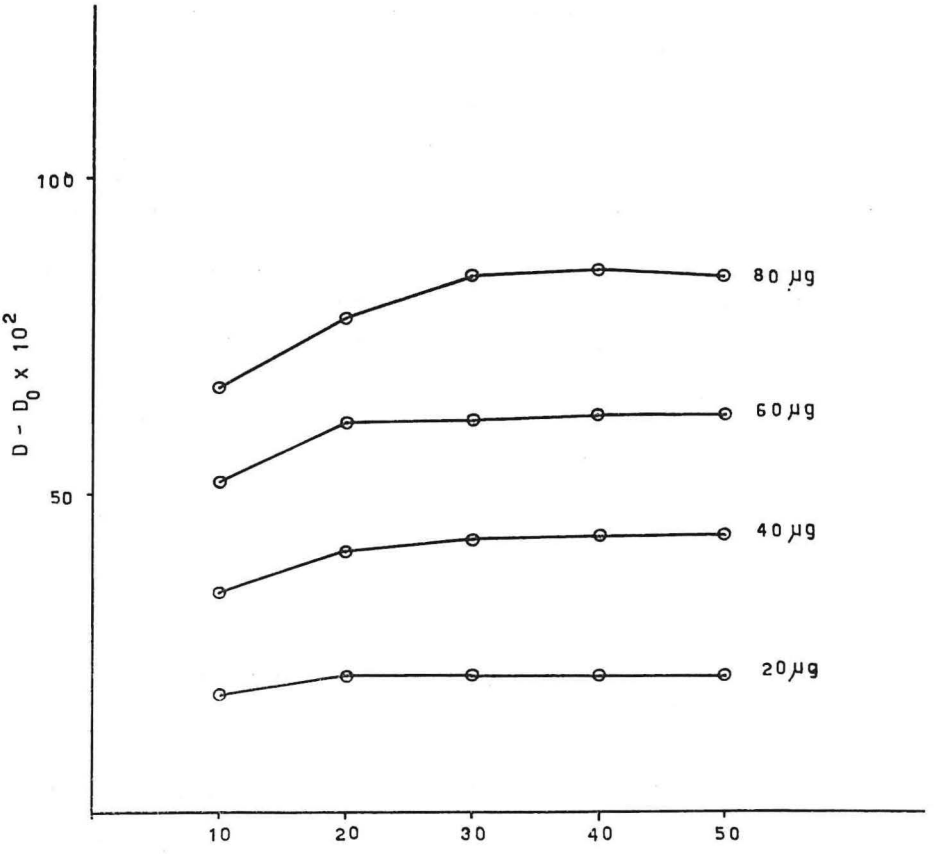
Come si può vedere dal grafico di figura 11 il tempo di sosta in bagno bollente dei campioni di alcole metilico, ha una influenza notevole sulla densità ottica letta. Le densità ottiche di ogni campione crescono fino ai 30' e si mantengono poi pressochè costanti per tempi

---

[1]) Si è osservato che immergendo i campioni da sviluppare in una soluzione di K_2CO_3 g 1000/L portata all'ebollizione (T_{eb} = 111° C circa); si ottenevano in 20' le stesse colorazioni che con il bagno d'acqua bollente e 30' di sosta.

Fig. 11 - INFLUENZA DEI TEMPI DI EBOLLIZIONE SULLE DENSITA' OTTICHE.

In ordinata sono riportate le densità ottiche assolute $\times 10^2$ di quattro campioni contenenti 20 - 40 - 60 - 80 μg/ml di alcole metilico, in ascissa i tempi di ebollizione in minuti.



superiori, salvo piccole oscillazioni. Il tempo optimum di 30' di ebollizione è stato adottato nel corso delle esperienze. Le provette ben tappate erano tenute in bagno d'acqua bollente per 30' [1]) ed il tempo era computato a partire dall'istante in cui il bagno raffreddato, si

---

[1]) Si deve porre particolare attenzione a che l'ebollizione sia molto vivace. Si consiglia di immergere le provette ben tappate in un bicchiere d'acqua da 1 litro riempito per 3/4 e contenente due cucchiai piccoli (10 g ca.) di sale da cucina, facendo attenzione di mantenere sempre lo stesso livello.

metteva a bollire nuovamente. Dopo ebollizione le provette venivano raffreddate immergendole in un bicchiere d'acqua e lette dopo due ore. Si è trovato che la trasmittanza dei singoli campioni di alcole metilico diminuiva gradatamente entro le prime due ore (con un massimo dopo la prima ora), dopochè diventava costante e permaneva stabile per altre 5-6 ore. L'abbassamento di trasmittanza dopo due ore era di 1% ca. per la soluzione di 40 μg/ml di CH_3OH.

Rendimento della reazione di ossidazione

Una volta analizzati tutti i singoli fattori che influenzano la determinazione dell'alcole metilico e cioè: quantità di $KMnO_4$, concentrazione in H_3PO_4, tempo di ossidazione, quantità di acido cromotropico aggiunto, contenuto alcolico percentuale, temperatura di ossidazione, periodo di sosta dopo aggiunta di Na_2SO_3, temperatura di sviluppo del colore e tempo di ebollizione, e adottate le condizioni di esperienza definitive, si è reputato opportuno analizzare i rendimenti della reazione di ossidazione:

1) $5\ CH_3OH + 2\ MnO_4' + 6\ H^{\bullet} \rightarrow 5\ HCOH + 2\ Mn^{\bullet\bullet} + 8\ H_2O$

Per fare ciò si è partiti da una soluzione di aldeide formica di cui si è determinato il titolo con due metodi, cioè per ossidazione con Jodio in soluzione alcalina, e con cloruro di idrossilamina, secondo Vogel (29). Si è sviluppato il colore nelle identiche condizioni sperimentali del metodo di determinazione dell'alcole metilico e si sono ottenuti i dati riportati nel diagramma di figura 12.

La reazione colorata dell'acido cromotropico-aldeide formica segue la legge di Lambert-Beer fino ai 10 μg/ml ca.

Si sono stimati quindi i rendimenti su una serie di valori ottenuti da una delle esperienze eseguite (da 20 a 120 μg/ml di CH_3OH, limite superiore di validità della legge di Lambert-Beer, con il metodo adottato). Il procedimento è stato il seguente: si sono calcolati i valori teorici in CH_2O tenendo presente che CH_2O teorico $= CH_3OH \times \frac{30}{32}$ in base alla 1), se tutto il CH_3OH è ossidato a CH_2O. Il valore delle densità ottiche delle soluzioni di metanolo era letto quindi sul diagramma di figura 12, da cui si deduceva il contenuto reale di CH_2O presente dopo la reazione di ossidazione. Il rendimento effettivo era calcolato in base a: $\frac{CH_2O \text{ trovato}}{CH_2O \text{ teorico}} \times 100.$

I dati sono riportati nella tabella 4 di seguito.

Fig. 12 - ALDEIDE FORMICA.

In ordinata sono riportate le quantità di HCOH in μg/ml, in ascissa le densità ottiche $\times 10^2$.

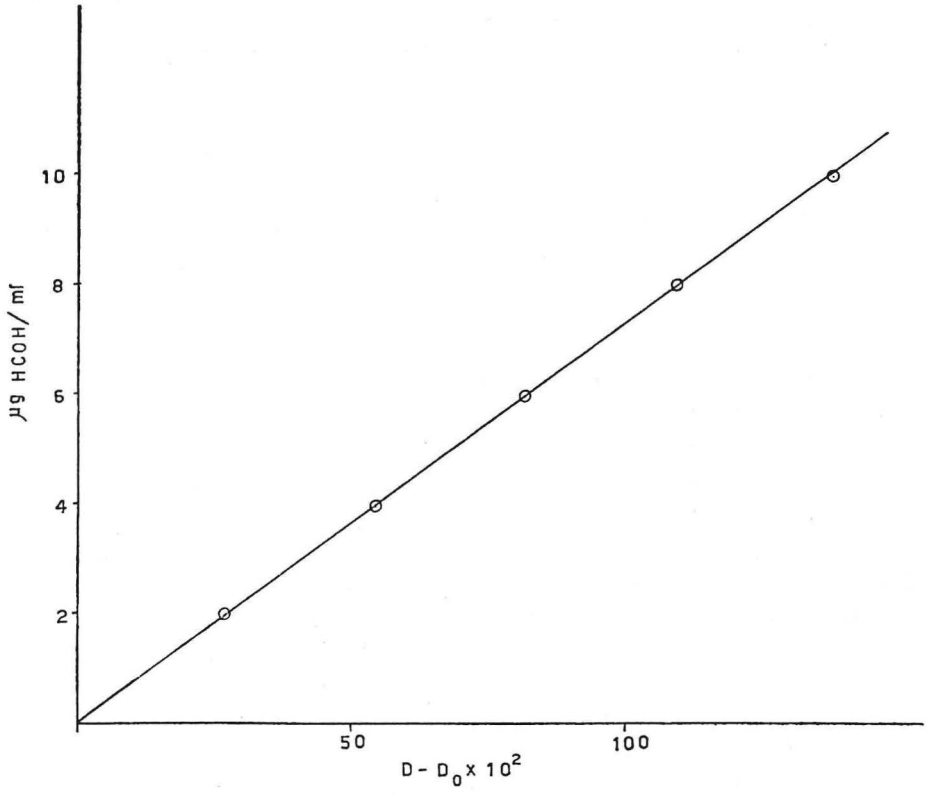


TABELLA 4

μg/ml di CH_3OH	densità ottiche assolute	μg/ml di CH_2O trovato	μg/ml di CH_2O teorici	Rendimento %
20	20.0	1.5	18.75	8.0
40	39.8	2.9	37.50	7.7
60	60.2	4.4	56.25	7.8
80	81.0	5.9	75.00	7.9
100	102.3	7.4	93.75	7.9
120	122.0	8.9	112.50	7.9

Dai rendimenti riportati in tabella si rileva che, nelle condizioni sperimentali adottate per la determinazione del metanolo, i rendimenti sono sufficientemente costanti fino ad una concentrazione di 120 μg/ml di CH_3OH. Le densità ottiche assolute, riportate nella seconda colonna della tabella 4, si riferiscono a una delle numerose serie di letture ottenute. E' rilevante notare che il rendimento è costante entro l'intervallo 0-120 μg/ml di metanolo con una concentrazione in $KMnO_4$ pari a 5 mg/ml. Al di sopra dei 120 μg/ml si ha una brusca diminuzione delle rese, che corrisponde all'incurvamento verso l'asse delle ordinate della retta di figura 13, in cui sono riportate le densità ottiche della serie di soluzioni di metanolo della tabella 4, in funzione della concentrazione.

Fig. 13 - Diagramma delle densità ottiche di una serie di soluzioni di metanolo, da 20 a 120 μg/ml.

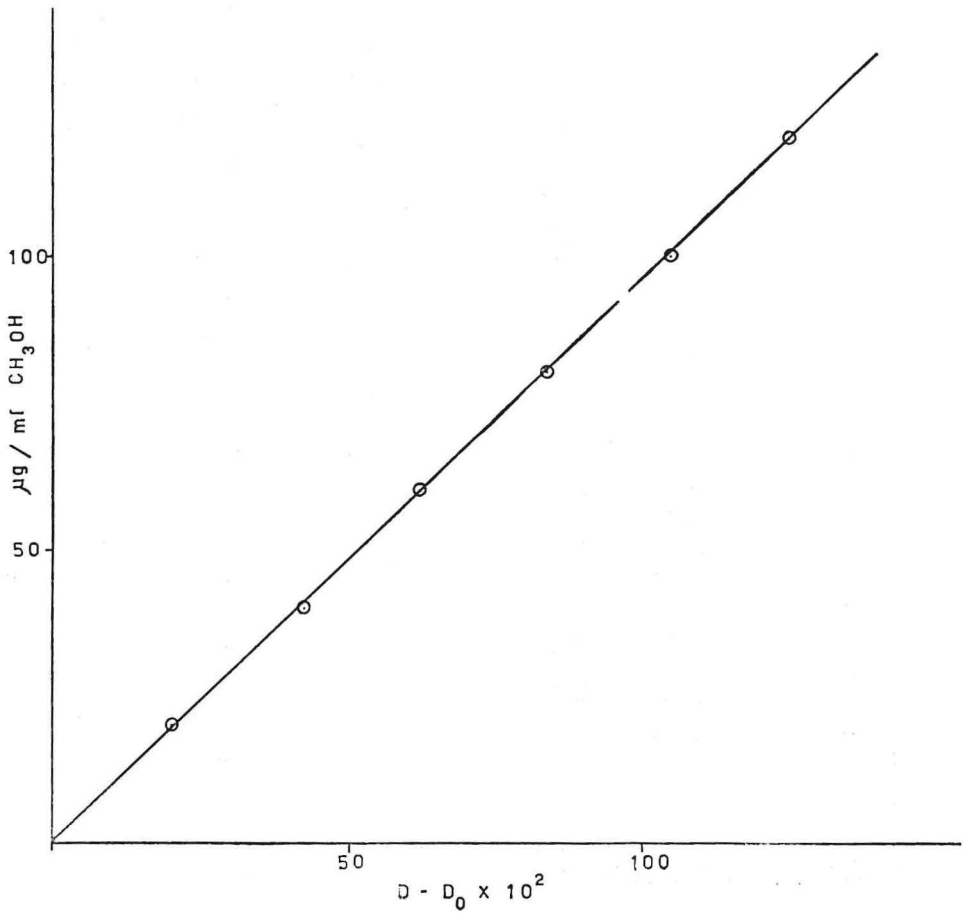


TABELLA 5

Fattori e prese in ml di Vino da distillare - Metodo Acido Cromotropico

$$\text{Fattore}^{1)} = \frac{200}{\text{ml presa}} \qquad \text{Presa} = \frac{500}{\text{Grado alcolico}}$$

Grado alcolico ml/100 ml	Presa in ml	Fattore	Grado alcolico ml/100 ml	Presa in ml	Fattore
7.00	71.43	2.80	.90	50.50	3.96
.10	70.42	2.84	10.00	50.00	4.00
.20	69.44	2.88	.10	49.50	4.04
.30	68.49	2.92	.20	49.02	4.08
.40	67.57	2.96	.30	48.54	4.12
.50	66.67	3.00	.40	48.08	4.16
.60	65.79	3.04	.50	47.62	4.20
.70	64.93	3.08	.60	47.17	4.24
.80	64.10	3.12	.70	46.73	4.28
.90	63.29	3.16	.80	46.30	4.32
8.00	62.50	3.20	.90	45.87	4.36
.10	61.73	3.24	11.00	45.45	4.40
.20	60.98	3.28	.10	45.04	4.44
.30	60.24	3.32	.20	44.64	4.48
.40	59.52	3.36	.30	44.25	4.52
.50	58.82	3.40	.40	43.86	4.56
.60	58.14	3.44	.50	43.48	4.60
.70	57.47	3.48	.60	43.10	4.64
.80	56.82	3.52	.70	42.73	4.68
.90	56.18	3.56	.80	42.37	4.72
9.00	55.55	3.60	.90	42.02	4.76
.10	54.94	3.64	12.00	41.67	4.80
.20	54.35	3.68	.10	41.32	4.84
.30	53.76	3.72	.20	40.98	4.88
.40	53.19	3.76	.30	40.65	4.92
.50	52.63	3.80	.40	40.32	4.96
.60	52.08	3.84	.50	40.00	5.00
.70	51.55	3.88	.60	39.68	5.04
.80	51.02	3.92	.70	39.37	5.08

---

[1]) Il valore del metanolo in mg/L si ottiene dalla formula:
CH_3OH mg/L = μg CH_3OH × Fattore.

Grado alcolico ml/100 ml	Presa in ml	Fattore	Grado alcolico ml/100 ml	Presa in ml	Fattore
.80	39.06	5.12	14.00	35.71	5.60
.90	38.76	5.16	.10	35.46	5.64
13.00	38.46	5.20	.20	35.21	5.68
.10	38.17	5.24	.30	34.96	5.72
.20	37.88	5.28	.40	34.72	5.76
.30	37.59	5.32	.50	34.48	5.80
.40	37.31	5.36	.60	34.25	5.84
.50	37.04	5.40	.70	34.01	5.88
.60	36.76	5.44	.80	33.78	5.92
.70	36.50	5.48	.90	33.56	5.96
.80	36.23	5.52	15.00	33.33	6.00
.90	35.97	5.56			

Procedimento analitico di determinazione dell'alcole metilico nei vini

Dopo aver passato in rassegna l'influenza dei vari fattori che agiscono sulla determinazione dell'alcole metilico in soluzione alcolica, ed aver illustrato via via le condizioni sperimentali ottimali, si è giunti all'elaborazione di un metodo di determinazione del metanolo nei vini che è stato applicato nel nostro laboratorio per tre anni di seguito.

I valori ottenuti per centinaia di campioni di vino sono stati confrontati con i corrispondenti dati ottenuti con il procedimento della fucsina.

Il metodo nella sua elaborazione definitiva è il seguente:

— Si distilla una quantità di vino tale da contenere 5 ml di alcole etilico (vedi tabella 5), lavando i bordi del pallone di distillazione con 10-15 ml di H_2O [1]). Si raccoglie il distillato su un matraccio tarato da 200 ml, cercando di non superare l'80% della presa. La concentrazione finale in C_2H_5OH nel distillato è del 2.5%.

— A 1 ml del distillato introdotto in una provetta da 15 ml, munita di tappo in plastica a buona tenuta, si aggiungono 0.2 ml di $KMnO_4$ al 3% in acido fosforico 1 N (g 3.84 di H_3PO_4 85% in 100 ml).

---

[1]) Si è reso necessario aumentare la presa di vino altrimenti troppo esigua.

— Si tiene la provetta in termostato a 20° C per 20' esatti agitando di tanto in tanto. Allo scadere dei 20' si aggiungono rapidamente 0.2 ml di Na_2SO_3 all'8%, agitando nuovamente e tappando subito. Si lascia per altri 5', dopo di che si leva la provetta e la si immerge in un bicchiere contenente acqua e ghiaccio.

— Si aggiungono goccia a goccia, e con leggero movimento rotatorio della provetta, 3 ml di acido cromotropico 0.05% a 0° C ca.

— Si tappa per bene nuovamente e si tiene il saggio in bagno d'acqua bollente per 30', dopo di che si raffredda la provetta e si legge allo spettrofotometro a 570 mμ dopo due ore o più.

Modificazione per sopratorchiati

Nel caso dei sopratorchiati e dei vini di veloce-pressa, si devono determinare tenori in alcole metilico particolarmente elevati. Il valore più alto dei campioni analizzati in Friuli è stato di 0.590 ml/100 ml di C_2H_5OH, pari a 374 mg/L.

Nel Veneto sono stati trovati (30) dei valori medi del « torchio » rosso dello 0.365 ml/L con massimi fino a 0.756, corrispondenti a 289 e 599 mg/L [1]). Ciò significa che si deve determinare con maggiore frequenza il CH_3OH in soluzioni contenenti circa 70 μg/ml fino a un massimo di 150 μg/ml (limite superiore dei campioni con 600 mg/L di CH_3OH).

Essendo l'intervallo di massima precisione delle letture colorimetriche compreso tra lo 0.20 e lo 0.80 di densità ottica (26), ne viene di conseguenza che nel caso dei torchiati il contenuto in metanolo dei valori più alti, da 100 μg/ml in su, esce dal campo di massima precisione se si adotta la metodologia già riportata per i vini.

Al fine di far rientrare le misure colorimetriche entro l'optimum

---

[1]) Nel valutare il contenuto in CH_3OH è senz'altro auspicabile adottare la terminologia francese, universalmente accettata, cioè dare il contenuto in alcole metilico in mg/L.

Per risalire dal valore in alcole metilico dato in ml/100 ml di C_2H_5OH, così diffuso in Italia, al valore in mg/L si è adottata la formula:

$$\underset{(\text{mg di } CH_3OH/L)}{M} = m \cdot \frac{A}{10} \cdot 0.7924 \cdot 10^3$$

m = ml di CH_3OH/100 ml di C_2H_5OH

$$m \cdot \frac{A}{10} = \text{ml di } CH_3OH/L \text{ di vino}$$

dove d_{20}^{20} dell'alcole metilico = 0.7924.

dello 0.20 - 0.80 di densità ottica, due erano le vie possibili, o aumentare la concentrazione alcolica, o diminuire la quantità di ossidante.

Si è seguita questa seconda procedura. In figura 14 si riporta il grafico ottenuto con una serie di soluzioni di alcole metilico ossidate con permanganato di potassio all'1% in soluzione normale di H_3PO_4.

Per il resto si è seguita la medesima metodologia già riportata per i vini.

La concentrazione in $KMnO_4$ nel caso dei torchiati diviene quindi 1.67 mg/ml contro i 5 mg/ml nei vini a basso contenuto in metanolo.

Come si può constatare la legge di Lambert-Beer conserva la sua validità fino a valori molto alti di CH_3OH, 200 μg/ml almeno, mentre le rese in CH_2O si abbassano notevolmente (2.7% contro il 7.8%).

Infine si può constatare, secondo quanto ci si era prefissi, che le densità ottiche dei maggiori valori in CH_3OH, da 70 a 160 μg/ml, cadono ampiamente entro l'intervallo di massima precisione delle misure spettrofotometriche.

Reagenti e apparecchiature

Per la determinazione dell'alcole metilico nei vini, si sono usati gli stessi prodotti chimici già riportati nella parte sperimentale, ed il seguente materiale:

— Apparecchi da distillazione con giunti smerigliati (i giunti in gomma danno standard leggermente alti e irregolari a causa della difficoltà di eliminare gli inquinamenti), refrigeranti a doppia camicia, canne di sviluppo lunghe e strette, onde poterle immergere per un buon tratto nel collo del matraccio, ed evitare le perdite di alcole.

  Per il resto l'apparecchio è lo stesso che si adopera per determinare l'alcole per distillazione nei vini.

— Matracci a tappo smerigliato di 200 ml di capacità.

— Due pipette da 0.5 ml tarate a 0.1 ml per la soluzione ossidante e riducente. Una pipetta da 5 ml tarata a 1 ml.

— Pipette comuni per il prelevamento del vino.

— Un termostato munito di un agitatore efficiente e che garantisca i 20 ± 0.2° C.

— Provette da 15 ml con tappo in plastica a pressione.

— Spettrofotometro « Spectronic 20 ».

Le soluzioni adoperate erano:

— Acido cromotropico (sale bisodico dell'acido 1,8-diidrossi-naftalen-3,6 - disolfonico) allo 0.05%: 100 mg vengono sciolti a freddo in 200 ml di acido solforico al 75% in peso d = 1.67 ca. (ml 70.3 di H_2O + 263.6 g di H_2SO_4 1.84 d.).

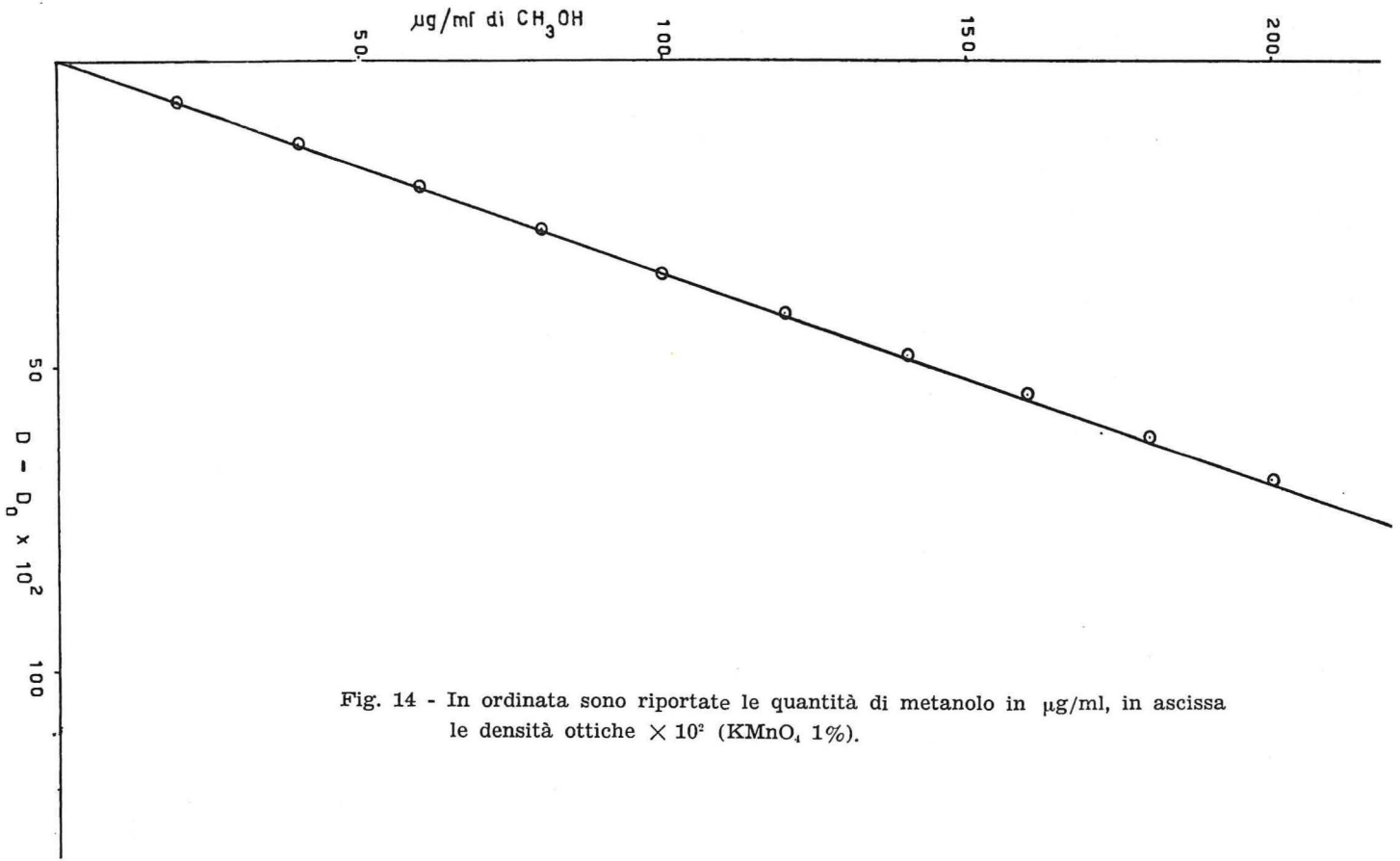


Fig. 14 - In ordinata sono riportate le quantità di metanolo in µg/ml, in ascissa le densità ottiche $\times 10^2$ ($KMnO_4$ 1%).

— 3 g di $KMnO_4$ sciolti in 100 ml di una soluzione 1 N in H_3PO_4 (g. 3.84 ca. cioè 2.25 ml ca. di H_3PO_4 portati a 100 ml).

— Na_2SO_3 anidro g 8 portati a 100 ml.

Osservazioni sul metodo

Qualche autore (27 - 28 - 31) prescrive la distillazione frazionata con un rapporto elevato di riflusso, al fine di concentrare il liquido originale per rettificazione. Sono state studiate e adottate apparecchiature con colonne di rettifica speciali ed alti rapporti di riflusso (20 : 1), onde ottenere un arricchimento preferenziale in metanolo nel distillato, quando quest'ultimo è presente nella soluzione alcolica in quantità inferiore allo 0.05%. Non bisogna dimenticare però che difficilmente in pratica si ottiene un ricupero del 100% degli alcoli presenti come ha fatto osservare il Guymon (32).

Alla distillazione frazionata, nel caso specifico dei vini, si oppongono due altri motivi di ordine pratico. Il primo è la grande facilità d'inquinamento, che è assai probabile in un'apparecchiatura complessa e difficilmente lavabile, quale quella del distillatore di rettifica, a causa della grande sensibilità del metodo all'acido cromotropico.

Il secondo motivo è, secondo quanto ha rilevato Jacquin e Tavernier (2), che pur ammesso che il quoziente di rettificazione del metanolo rispetto all'alcole etilico sia maggiore di 1, il che in pratica non è, ben poco si guadagna a concentrare il distillato. Per rendersi conto di ciò basta osservare il grafico di figura 8. Aumentando il valore del metanolo e dell'etanolo nel campione, l'aumento della densità ottica del saggio è irrisorio e ciò perchè le densità ottiche diminuiscono con l'aumentare della concentrazione in alcole etilico. Si è accertato d'altronde che una distillazione semplice del campione di vino, ben condotta e a fiamma non troppo alta, riesce ad estrarre tutto il metilico presente ed esclude le sostanze che potrebbero interferire nella reazione acido cromotropico-metanolo-formaldeide.

Che la distillazione semplice con l'apparecchiatura descritta riesca ad estrarre tutto l'alcole metilico nel vino, è dimostrato dai seguenti dati ottenuti in 4 campioni di vino aggiunti di 50 mg di metanolo/L:

TABELLA 6

N.	CH_3OH in mg/L determinato	CH_3OH in mg/L + 50 mg/L (calcolato)	CH_3OH in mg/L determinato dopo l'aggiunta
1	51	101	102
2	81	131	130
3	129	179	181
4	142	192	195

Il tema delle interferenze è stato approfondito nel corso dello studio.

Delle sostanze volatili presenti nel vino, più di una interferisce nella reazione acido cromotropico-formaldeide. Secondo Deckenbrock (33) gli alcoli superiori e le aldeidi non interferiscono, mentre altre sostanze quali oli essenziali, furfurolo, glicerina, fruttosio e lattosio, pur interferendo, vengono eliminati con la distillazione.

Dei componenti volatili del vino elencati dal Ribéreau-Gayon (34) e riportati nella tabella 7, si è ricercato se influenzano la reazione con l'acido cromotropico ed in quale misura.

Come si può vedere, nell'ultima colonna sono riportate in μg/ml e in mg/L corrispondenti (supponendo di avere un vino di 10°) le quantità limite delle sostanze volatili, che non alterano la determinazione dell'alcole metilico nel vino. Tra parentesi sono segnate le quantità in μg/ml presenti nel distillato, effettuata la diluizione prescritta dal metodo, e corrispondenti ai valori massimi riportati per le sostanze volatili in colonna 5 (sempre supponendo di avere un vino di 10°). In colonna 6 sono riferite anche le colorazioni delle sostanze inquinanti.

Le prove sono state eseguite a concentrazioni determinate di sostanze volatili ossidate e aggiunte di acido cromotropico, in presenza del 2.5% di alcole etilico, lette in parallelo alla soluzione contenente soltanto il 2.5% di etanolo. Lo stesso procedimento è stato eseguito per ogni concentrazione, su due soluzioni, una contenente 20 μg/ml di CH_3OH una 20 μg/ml di CH_3OH e la sostanza inquinante, sempre in presenza del 2.5% di alcole etilico.

In base alle esperienze condotte si può concludere che, anche alle concentrazioni massime, i componenti volatili del vino riportati nella tabella 6, non influiscono decisamente nella determinazione dell'alcole metilico nel vino.

La riprova si è avuta quando si è sottoposto a distillazione due soluzioni: una contenente il 10% di alcole etilico e le sostanze volatili riportate in tabella 6, in quantità corrispondenti ai massimi segnati in colonna 5, l'altra con solo alcole etilico al 10%.

TABELLA 7: COMPONENTI VOLATILI DEL VINO (secondo Ribéreau-Gayon)

Gruppi	Nomi	Formule	Punto di ebollizione in C°	Tenore per litro	Interferenze
ALCOLI	Etilico	CH_3-CH_2OH	78.3	70-130 g	Non interferisce
	Propilico normale propanolo-1	CH_3-CH_2-CH_2OH	97.2	2-5 mg	Non interferisce fino a 20 mg/ml (1.25 μg/ml).
	Isopropilico propanolo-2	CH_3-CH-CH_3 (OH)	82.0	Presenza controversa	Non interferisce fino a 600 μg/ml.
	Isobutilico metil-2, propanolo-1	$(CH_3)_2$-CH-CH_2OH	107	100-250 mg	Non interferisce fino a 40 μg/ml. : 160 mg/l (63 μg/ml) colore giallo arancione.
	Amilico metil-2, butanolo-1	CH_3-CH_2-CH(CH_3)-CH_2OH	128	100-300 mg	Non interferisce fino a 100 μg/ml : 400 mg/l col. giallo chiaro (75 μg/ml)
	Isoamilico metil-3, butanolo-1	$(CH_3)_2$-CH-CH_2-CH_2OH	131		
	Alcoli superiori esilico, eptilico, etc.			1-3 mg	Non interferisce (0.8 μg/ml).
	Acetato di etile	CH_3-$COOC_2H_5$	77	180-200 mg (nei vini spunti)	Non interferisce (50 μg/ml).
ALDEIDI e derivati	Acetaldeide	CH_3-COH	20.2	40-120 mg/L	Non interferisce fino a 100 μg/ml : 400 mg/l (30 μg/ml) col. giallo citrino.
	Ossimetilfurfurolo	HC—CH ‖ ‖ HO-H_2C-C C-COH \ O /		1 mg (nei vini cotti)	Non interferisce fino a 100 μg/ml : 400 mg/l (0.25 μg/ml) col. giallo verde.
DERIVATI CHETONICI	Acetilmetilcarbinolo (Acetoino)	CH_3-COCHOH-CH_3	144	4-25 mg	Non interferisce fino a 10 μg/ml : 40 mg/l (6.3 μg/ml).
	Diacetile	CH_3-COCOCH_3	87	0.5-2.5 mg	Non interferisce fino a 10 μg/ml : 40 mg/l (0.6 μg/ml) col. giallo arancio.

I due campioni di distillato su cui si è determinato l'alcole metilico secondo il metodo adottato, hanno dato allo spettrofotometro due valori uguali di densità ottica, pari ad una trasmittanza del 98.5%; corrispondente al valore che comunemente si otteneva per il « bianco ».

Da questa esperienza si può concludere che le sostanze volatili della tabella 7 non interferiscono nella determinazione dell'alcole metilico, semprechè la distillazione sia ben condotta, a fiamma non troppo alta.

Il metodo di determinazione dell'alcole metilico con l'acido cromotropico è stato confrontato, con il metodo classico della fucsina secondo Tavernier-Jacquin, per un notevole numero di campioni di vino e i risultati di questo confronto, che saranno riportati e commentati in un futuro lavoro, hanno messo in luce un buon accordo tra i due procedimenti.

Infine, allo scopo di stabilire la precisione del metodo, si è determinato il contenuto in metanolo su 14 campioni di distillato del medesimo vino, con basso tenore in CH_3OH. Evidentemente si sono potuti così valutare tutti gli errori possibili, compresa la distillazione più o meno spinta.

Il calcolo statistico delle 14 misure ottenute ha dato i seguenti risultati.

TABELLA 8

N.	Contenuto in CH_3OH mg/L	N.	Contenuto in CH_3OH mg/L
1	59	8	60
2	60	9	58.5
3	58.5	10	58.5
4	55.5	11	54
5	55	12	55.5
6	54	13	54
7	58	14	54

Media del CH_3OH in mg/L: 56.7
s (deviazione standard): ± 2.4
errore standard: ± 0.63
coefficiente di variabilità: 4.2%
limiti fiduciari per t 0.01 $\begin{matrix} 58.6 \\ 54.8 \end{matrix}$

Se si considera che il metodo ufficiale, come è comunemente applicato, pur facendo uso del colorimetro (e non della valutazione visiva), non permette di dare in condizioni normali una precisione superiore alla 2ª cifra decimale ± 0.01, pur tralasciando il fatto che l'infelice scelta del tempo di ossidazione di 2' porta in effetti ad una notevole

percentuale di risultati completamente errati (1), si comprende come il metodo dell'acido cromotropico secondo il procedimento descritto nel presente lavoro, permette di dare una notevole sicurezza ed una precisione nettamente superiore a quella del metodo ufficiale italiano.

Riassunto

Si sono esaminati tutti i fattori che interferiscono nella determinazione dell'alcole metilico con l'acido 1,8-diidrossi-naftalen-3,6-disolfonico: concentrazione del $KMnO_4$, dell'H_3PO_4, tempi di ossidazione, quantità di acido cromotropico aggiunta, temperatura, contenuto alcolico %, tempi di sosta dopo aggiunta del sodio solfito e tempi di ebollizione.

Si è anche determinato il rendimento percentuale della reazione di ossidazione: $5\ CH_3OH + 2\ MnO_4' + 6\ H^{\bullet} \rightarrow 5HCOH + 2Mn^{2\bullet} + 8\ H_2O$ e si è elaborato un metodo che adotta una concentrazione del 3% di $KMnO_4$ per i vini normali, dell'1% per i sopratorchiati e vini di veloce - pressa o comunque aventi alto contenuto di alcole metilico ($>$ 300 mg/L).

Summary

All the factors are examined influencing the determination with chromotropic acid of methanol, previously oxidized to formic aldehyde, in presence of ethyl alcohol, that is: $KMnO_4$, H_3PO_4 concentration, oxidation time, chromotropic acid added, temperature, alcoholic content, time elapsed after the addition of Na_2SO_3, time of boiling.

Yeld has been determined of the oxidation reaction:

$5\ CH_3OH + 2\ MnO_4' + 6\ H^{\circ} \rightarrow 5\ HCOH + 2\ Mn^{2\bullet} + 8\ H_2O$

and a method is reported for determining methanol in the wines using chromotropic acid (1,8-dihydroxy-naphtalen-3,6-disulfonic acid) and $KMnO_4$ 3% for lower contents of methanol, $KMnO_4$, 1% for higher contents of methanol (more than 300 mg/L).

L'autore desidera ringraziare la signorina De Ros A. e il signor Foschiani L. per la valida collaborazione.

BIBLIOGRAFIA

1 GIGLIOTTI A. - Il contenuto in metanolo dei vini friulani nella vendemmia del 1965 - *Nuovi studi della Stazione chimico-agraria sper. di Udine,* N. 97, 10-16, 1968.

2 JACQUIN P., TAVERNIER J. - Microdosage colorimétrique du methanol - *Ann. de Techn. Agric.,* 2, 113-136, 1953.

3 HOFFPAUIR C. L., O'CONNOR R. I. - *Analytical Chemistry* 21, 420, 1949.

4 PAECH K., TRACEY M. V. - Modern methods of plant analysis. Vol. II, Springer Verlag, 415, 1955.

5 DENIGÈS G. - Recherches de méthanal en presence d'éthanal par la fuchsine bisulfitée - *C.R.Ac.Sc.,* 150, 529, 2, 1910.

6 BERTRAND G., SILBERSTEIN L. - *C.R.Ac.Sc.* 226, 365, 1948.

7 BOUZIGUES Mme L. - Sur le dosage du méthanol en présence d'éthanol électrophotométrique - *Ann. Techn. Agric.* N. 2, 223-234, 1955.

8 MATHERS A. P., PRO M. J. - *Analytical Chemistry* 27, 1662-4, 1955.

9 LANGEJAN M. - *Pharm. Weekblad* 92, 667-70, 1957.

10 SCHRYVER S. B., WOOD C. C. - *Analyst* 45, 164-170, 1920.

11 DESNUELLE P., NAUDET M. - Microdosage colorimétrique du formol - *Bull. Soc. Chim.* 12, 872, 1945.

12 EEGRIWE E. - Reaktionen und reagenzien zum nachweis organischer verbindungen - *Z. Anal. Chem.* 110, 22, 1937.

13 BOYD M. J., LOGAN M. A. - Colorimetric determination of serine - *J. Biol. Chem.* 146, 279-287, 1942.

14 BRICKER C. E., JOHNSON H. R. - Spectrophotometric method for determining formaldehyde - *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 17, 400-2, 1945.

15 MAC FADYEN D. A. - *J. Biol. Chem.* 158, 107, 1945.

16 BOOS R. N. - Quant. color. microdetn. of methanol with chromotropic acid reagent - *Analytical Chemistry* 20, 964-5, 1948.

17 NOVELLI A. - Tecnica sencilla par la determ. de alcohol metilico en alcohol etilico - *An. de la Direccion Nac. de Quimica,* 6. III, 1950.

18 COPELLO M. A. - Appl. de la reaccion de Eegriwe a la invest. y valor. de alcohol metilico en alcoholes y bebidas - *Ann. de la Direccion Nac. de Quim.* 3, 81-4, 1940.

19 COLAGRANDE O. - Sulla determ. color. del metanolo nei vini - *Annali della Facoltà di Agraria,* Vol. LXXIX, Serie VIII, fasc. III, 168-177, Dic. 1960.

20 YAMAMURA S., MATSUOKA T. - Color. detn. of methanol in ethanolic solutions with chromotropic acid. (Kyoto city Ind. Res. Lab.) - *J. Society Brewing Japan* 49, 111-5, 1954.

21 BRICKER C. E., VAIL W. A. - Microdetn. of formaldehyde with chromotropic acid. - *Anal. Chem.* 22, 720, 1950.

22 MATHERS A. P. - *J. Ass. Off. Agr. Chemists,* 38, 753-6, 1955.

23 AKIYA S., SASAO H. - Determination of methanol in wines by chromotropic acid (University of Tokyo) - *J. Pharmac. Soc. Japan* 71, 1325-6, 1951.

24 MARIANI A. - La determinazione di piccole quantità di alcole metilico nell'etilico - *Rend. Ist. Sup. San.* 13, 11, 1950.

25 FEIGL F. - Spot tests in organic analysis - Elsevier Publ. Co., New York, 7th Ed. 1960.

26 RINGBOM A., SUNDMAN F. - *Z. Anal. Chem.* 116, 104, 1939.

27 TOLU LIBERO A. - La determinazione dell'alcol metilico nei vini - *Riv. di Vitic. Enol.* 12, 419-426, 1962.

28 GEORGIA F. R., MORALES R. - *Ind. Eng. Chem.* 18, 304-306, 1926.
29 VOGEL A. I. - Elementary practical organic chemistry. I Ed. Longmans, Green and Co. Ltd., London WI 5th imp. 1965.
30 CAPPELLERI G. - Sulla composizione dei principali vini prodotti nel Veneto - *Riv. di Vitic. ed Enol.* 189-216, 4, 1968.
31 Methods of analysis of the Assoc. of official agric. chemists, 9th Ed., Ass. of Agric. Chemists, Washington 4, D. C., 109, 1960.
32 GUIMON J. F. - *Journal Ass. Off. Agr. Chem.* 34, 310-327, 1951.
33 DECKENBROCK W., SPRICK M. - The methanol content in spirituous liquors - *Brauntweinwirtschaft* 75, 1-4, 1953.
34 RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E. - Analyse et controle des vins, deuxieme édition, 262. Librairie Polytechnique ch. Béranger, Paris 15 Rue des Saints-Pères, 1958.